Steroidrezeptorstatus humaner Tumoren

Entwicklung und Einsatz eines computergesteuerten Analyse- und Auswertesystems für zytosolische Steroidrezeptoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Dieter Petzinna
aus Düsseldorf

Düsseldorf 1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0010

STEROIDREZEPTORSTATUS HUMANER TUMOREN

Entwicklung und Einsatz eines computergesteuerten Analyse- und Auswertesystems für zytosolische Steroidrezeptoren.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Düsseldorf

vorgelegt
von
Dieter Petzinna
aus Düsseldorf

Düsseldorf 1983

1. Berichterstatter : Prof. Dr. W. Staib

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 2.2.1984

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Definition der Hormonrezeptoren	1
1.2	Membranständige Hormonrezeptoren	2
1.3	Intrazelluläre Hormonrezeptoren	3
1.4	Nachweismethoden	4
1.5	Rezeptorstatus und Proliferationsaktivität	7
1.5.1	Mammakarzinom	7
1.5.2	Andere humane Tumoren	9
1.6	Problemstellung	11
1.6.1	Instabilität des Rezeptorproteins	11
1.6.2	Mammmakarzinom	12
1.6.3	Tumore der Keimorgane, des Kolons und der Leber	13
2.	Material und Methoden	15
2.1	Humane Tumoren	15
2.2	Chemikalien, Radiochemikalien und Scintillatoren	16
2.3	Hormonrezeptornachweis	16
2.3.1	Mehrpunkt-Dextrankohleassay	17
2.3.2	Saccharose-Gradientenzentrifugation	17
2.3.3	Histochemische Untersuchungen	18
2.3.4	Bezugssysteme	20
2.4	Qualitätskontrolle	21
3.	Ergebnisse	22
3.1	Entwicklung des Analysesystems	22
3.1.1	Wahl des Rechners	22
3.1.2	Beschreibung der Gerätekonfiguration	23
3.1.3	Beschreibung der Software	26
3.1.4	Funktion	32

		Seite
3.1.5	Reproduzierbarkeit	33
3.2	Entwicklung thermostabiler Rezeptorpräparationen	35
3.3	Histochemische Untersuchungen	39
3.4	Mammakarzinom	41
3.4.1	Östrogen- und Gestagenrezeptorverteilung	41
3.4.2	Altersabhängigkeit	44
3.4.3	Methodenvergleich: Dextrankohleassay/Gradientenzentrifugation	49
3.4.4	Korrelation Östrogenrezeptor/Gestagenrezeptor	51
3.4.5	Gestagenrezeptor positive Östrogenrezeptor negative Tumore	52
3.4.6	Betrachtung des "Rezeptorwechsels"	52
3.4.7	Jahreszeitliche Schwankungen	53
3.5	Ovarialkarzinom	55
3.5.1	Untersuchungen des Östrogenbinders	55
3.5.2	Untersuchungen des Gestagenbinders	59
3.5.3	Östrogen-/ Gestagenrezeptormuster	60
3.6	Hodentumore	64
3.6.1	Östrogenrezeptoren	64
3.6.2	Gestagenrezeptoren	64
3.6.3	Androgenrezeptoren	65
3.6.4	Glucocorticoidrezeptoren	65
3.7	Kolorektale Karzinome	68
3.7.1	Östrogenrezeptoren	68
3.7.2	Gestagenrezeptoren	70
3.7.3	Glucocorticoidrezeptoren	70

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

AR	Androgenrezeptor
cpm	Impulse pro Minute
DCC	Dextran-coated-charcoal
	(= dextranbeschichtete Aktivkohle)
DES	Diäthylstilböstrol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DHT	Dihydrotestosteron
dpm	Zerfälle pro Minute
E_2	17ß-Östradiol
FSH	Follikel stimmulierendes Hormon
ÖR	Östrogenrezeptor
GR	Glucocorticoidrezeptor
K_D	Dissoziationskonstante
LH	luteinisierendes Hormon
PR	Progesteronrezeptor
rpm	Umdrehungen pro Minute
R 1881	Methyltrienolon
R 5020	Promegeston
RNA	Ribonucleinsäure
S	Svedbergeinheit (10^{-3}sec)
SHGB	Sex Hormon bindendes Globulin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

1.1 Definition der Hormonrezeptoren

Seit Ehrlich (1903) und Langley (1905) haben Pharmakologen und Endokrinologen versucht, die Wirkung eines Pharmakons bzw. Hormons auf eine "Zielzelle" mit Hilfe eines Rezeptors zu beschreiben.
Nachdem Jensen und Jacobson (1960, 1962) in Zielgeweben mit Hilfe von tritiiertem 17ß-Östradiol eine spezifische Bindungskomponente mit hoher Affinität für Östrogene nachgewiesen hatten, begannen viele Arbeitsgruppen, sich mit Rezeptoren zu beschäftigen.
Mehrere Bedingungen müssen erfüllt sein, damit ein hormonbindendes Molekül als Rezeptor bezeichnet werden kann:

A. Spezifische Bindung von Hormonen und ggf. Antihormonen

Hierbei ist der Begriff "spezifisch" im Sinne von stereochemischer Selektivität zu sehen; das heißt, die Fähigkeit, mit Molekülen, die einen ähnlich räumlichen Aufbau besitzen, Komplexe zu bilden. Allerdings werden in der Literatur manchmal die Begriffe "spezifisch" und "hochaffin" synonym verwendet.

B. Hohe Affinität und begrenzte Kapazität

Wenn man die niedrigen Konzentrationen betrachtet, in denen Hormone im Blut physiologischer Weise vorliegen, kann man ein sinnvolles Zusammenspiel mit den Zielzellen nur durch eine hohe Affinität zum Rezeptor erklären. So liegen für alle Steroid-Rezeptor-Komplexe, die bisher identifiziert wurden, die Dissoziationskonstanten im Bereich der Konzentration freier Hormone im Blut.

C. Anwesenheit in Zielzellen

Als wichtigstes, fundamentales Kriterium muß die Verbindung Rezeptor/Zielzelle angesehen werden. Das Hormon muß rezeptorvermittelt im Zielgewebe nachweislich eine biologische Antwort auslösen.

1.2 Membranständige Hormonrezeptoren

Betrachtet man den molekularen Wirkungsmechanismus von Hormonen, muß man zwei grundlegend verschiedene Wirkungsweisen unterscheiden. Zum ersten den Angriff des Hormons an ein spezifisches Rezeptorprotein auf der Oberfläche von Zellmembranen, wodurch an der Innenseite die Bildung von zyklischem Adenosin-3',5'monophosphat (cAMP) induziert wird, das als allosterischer Effektor die katalytische Aktivität bestimmter Enzyme beeinflußt.
Als "first messenger" wird hierbei das extrazelluläre Hormon bezeichnet, das an der Oberfläche von Zellmembranen seiner jeweiligen Zielorgane gebunden wird und dann das Signal an die Adenylatcyclase weitergibt. Das daraufhin gebildete intrazelluläre cAMP wird als "second messenger" bezeichnet.

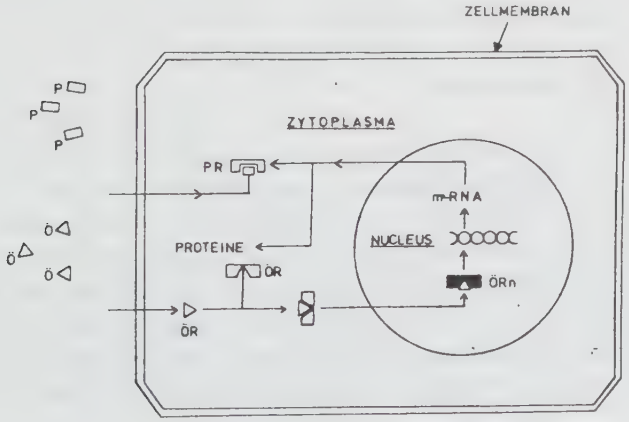
Abb. 1 zeigt ein Schema der Hormonwirkung über cAMP.

Für eine Vielzahl von Hormonen ist der Wirkungsmechanismus über membranständige Rezeptoren nachgewiesen worden. Hierzu zählen aus der Gruppe der Peptid- bzw. Proteohormone z.B. das LH, Insulin und das Glucagon, ebenso die Catecholamine (Adrenalin, Noradrenalin) und die Gruppe der Prostaglandine.

1.3 Intrazelluläre Hormonrezeptoren

Einen anderen als den oben beschriebenen Wirkungsmechanismus zeigen die Steroidhormone (Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Östrogene, Gestagene und Androgene) und die Schilddrüsenhormone Thyroxin und Trijodthyronin. Sie wirken über eine Induktion der Synthese von Enzymen und anderen Proteinen auf der Ebene der Transkription. Hormone dieses Wirkungsprinzips dringen in die Zelle ein und vereinigen sich im Zytoplasma mit einem spezifischen Protein zum Hormon-Rezeptor-Komplex, der in den Zellkern gelangt und dort auf bisher nicht vollständig geklärte Weise bestimmte Gene des Chromatins aktiviert.

Abb. 2 zeigt exemplarisch den Wirkungsmechanismus von Östrogenen.



Das Hormon (Ö=Östrogen) diffundiert durch die Zellmembran sowohl in die Zielzelle als auch in die Nichtzielzelle; jedoch nur Zielzellen besitzen ein spezifisches zytoplasmatisches Rezeptorprotein (ÖR). Durch Kombination beider entsteht ein Hormon-Rezeptor-Komplex, der nach Aktivierung in den Zellkern eindringt (Translokation)und dort bestimmte Gene aktiviert. Die m-RNA wird zur Translation ins Zytoplasma exportiert und bewirkt auf bekannte Weise die Biosynthese bestimmter Proteine. Zu den Proteinen, deren Synthese durch Östrogene induziert wird, gehört wie in Abbildung 2 dargestellt der Progesteronrezeptor (Horwitz u. Mc Guire 1975).
Steroide lösen in allen Zielgeweben ähnliche biologische Reaktionen aus.
Da die Steroidrezeptoren wegen ihrer distingten physiko-chemischen Eigenschaften mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit biochemisch zu identifizieren sind, sollte ein Nachweis auch in Geweben, in denen eine entsprechende hormonelle Abhängigkeit (noch) nicht bekannt ist, mit einer charakteristischen biologischen Antwort verbunden sein.
Da speziell Östrogene eine hohe Proliferationsaktiviät bewirken, befaßten sich einige Arbeitsgruppen mit der Frage, ob das bekanntlich schnelle Zellwachstum bei Malignomen einer östrogenen Kontrolle unterliegt.

1.4 Nachweismethoden

Zum Nachweis von Steroidhormonen sind verschiedene Methoden möglich. Etablierte Methoden bedienen sich radioaktiv markierter Steroidhormone. Routinemäßig werden heute zur Bestimmung zytosolischer Steroidrezeptoren im wesentlichen zwei verschiedene Methoden angewandt: die Dextrankohle-Methode und die Saccarose-Dichtegradientenzentrifugation. Beide sind nach dem Consensus Report der Konferenz "Steroid Receptors in Breast Cancer" (National Institute of Health, Bethesda,

Maryland, 27. - 29. Juni 1979) die z.Z. zuverlässigsten und reproduzierbarsten Methoden der Steroidrezeptoranalytik. Zwei weniger gebräuchliche Methoden sind die Protaminpräzipitation und die Agar-Gel-Elektrophorese (Einzelheiten über diese beiden Methoden sind bei Mc Guire et al., 1975a, 1975b, und bei Wagner, 1972, nachzulesen).

Alle klassischen Methoden zum Nachweis der Steroidrezeptoren sind Radioligandenmethoden der verschiedensten Variationen. Sie erlauben eine quantitative Bestimmung der Rezeptorkonzentration sowie, je nach Methode unterschiedlich, die Erfassung weiterer physikochemischer Charakteristika der Hormonrezeptorkomplexe. Jedoch besitzen diese Methoden auch Nachteile. So ist ein gut ausgerüstetes, biochemisches Labor Voraussetzung; und außerdem entstehen durch den relativ hohen Material- und Personalaufwand hohe Kosten für die Bestimmungen. Daneben stellt die gefundene Rezeptorkonzentration nur einen Mittelwert aus allen homogenisierten Zellen dar und berücksichtigt nicht das eventuelle Vorhandensein hormonsensitiver und -insensitiver sowie maligner und nichtmaliger Zellen. Außerdem wird bei der Bestimmung der Gewebeverband zerstört und der Rezeptor im fremden Milieu (Puffer) gehandhabt. Ein weiterer Nachteil ergibt sich daraus, daß bei kleineren Tumoren, Biopsien und Abstrichen nicht für die Analytik ausreichende Gewebsmengen gewonnen werden. Aus den geschilderten Gründen ist die Forderung nach histochemischen Methoden zum Rezeptornachweis einleuchtend.
Ein versuchter Weg bestand darin, daß die Bindungsstellen eines Gewebes mit 10^{-8} bis 10^{-7}M Östradiol abgesättigt wurden. Der Gefrierschnitt wurde dann mit einem spezifischen Östradiol-Antiserum versetzt. Der eingelagerte Antikörper wurde anschließend mit fluoreszensmarkiertem Antigammaglobulin sichtbar gemacht. Diese Technik wurde von Malan (1978), Mercer (1978) und Nenci (1976) beschrieben. Andere Autoren benutzten das gleiche Prinzip, markierten jedoch das Anti-IGg mit

Mikroperoxidase (Gapski 1975 und Ghosh 1978).

Die Autoren fanden unterschiedlich gute Korrelationen zu dem biochemischen Rezeptorassay. Weiterführende Untersuchungen in zellfreien Systemen zeigten jedoch, daß ein Steroid sich nicht gleichzeitig an einen Rezeptor und einen Antikörper binden kann (Castaneda 1975 und Fishman 1974).
Chamness (1980) konnte auch unter Bedingungen, unter denen kein zytoplasmatischer Rezeptor vorhanden sein durfte, mit o.g. Methoden unverminderte Fluoreszens im Zytoplasma nachweisen. Auch die Anwendung von Polyöstradiolen (Pertschuk 1978) brachte nicht den erhofften Erfolg, da polymerisiertes Östradiol nicht den Rezeptor bindet.
Andere Autoren versuchten fluoreszensmarkierte Steroid-Albumin-Konjugate zum Nachweis von Rezeptoren einzusetzen (Pertschuk 1978, Lee 1979, 1980, Gaetjens 1980). Einige dieser Steroid-Albumin-Konjugate, nämlich diejenigen von S.H. Lee, sind bereits im Handel erhältlich, und es soll möglich sein, damit "Steroidrezeptoren" nachzuweisen. Ich habe mich mit dieser Methode (siehe 3.3) auseinandergesetzt.

Auch die Anwendung von direkt fluoreszensmarkierten Steroiden konnte sich nicht durchsetzen. Dandliker (1977, 78) berichtete über die Synthese einiger Steroide mit kovalent gekoppelten Chromophoren, die eine relativ hohe Affinität zum Östrogen-rezeptor zeigen sollten. Daxenbichler (1982a) verglich den biochemischen Assay mit einer histochemischen Methode unter Verwendung von 1-(N)-Fluoreszeinylöstronsemicarbazon. Er fand bei 81% eine Übereinstimmung, fügte aber kritisch hinzu, daß dies kein tatsächlicher Beweis für die Richtigkeit dieser histochemischen Methode wäre.
Alle genannten histochemischen Methoden kranken daran, daß der Ligand die Affinität zum Rezeptor trotz abweichender Angaben einzelner Arbeitsgruppen stark herabsetzt. Hieraus ergibt sich die Frage, was beobachtet wird. Eine eindeutige Antwort ist

wohl kaum möglich. Hinzu kommt, daß bei in vivo Untersuchungen enzymatische Abspaltungen der Liganden wahrscheinlich sind. Bevor sich Rezeptornachweise basierend auf histochemischen Methoden etablieren können, bedarf es sicher noch vieler Forschungsarbeit.

1.5 Rezeptorstatus und Proliferationsaktivität

1.5.1 Mammakarzinom

Seit Beatson (1896) bei einem Teil inoperabler Mammakarzinome durch beiderseitige Ovarektomie Remissionen erzielte, zählt das Mammakarzinom zu den hormonabhängigen Tumoren. Dies führte in den 50iger Jahren zu ausgedehnten ablativen Palliativtherapieverfahren wie Adrenalektomie und Hypophysektomie (Huggins 1952, Bauer 1963). Aufgrund der hohen operativen Mortalität sowie der Notwendigkeit der Substitution hypophysenabhängiger, lebensnotwendiger Hormone (Kortikosteroide, Schilddrüsenhormone) setzten sich die Operationen im allgemeinen nicht durch und wurden durch medikamentöse Therapieformen weitgehend verdrängt (Henningsen 1980). So wurden Androgene (Kennedy 1965), Östrogene (Hayward 1970) und Gestagene (Pannuti 1979) zur Therapie des fortgeschrittenen Mammakarzinoms eingesetzt. In den letzten Jahren setzten sich besonders Anti-Östrogene, z.B. Tamoxifen (Tagnon 1977, Mouridsen 1978) aufgrund der geringeren Nebenwirkungen im Vergleich zu Östrogenen und Androgenen durch. Es zeigte sich jedoch bei allen endokrinen Therapien, daß nur bei etwa 30% der Fälle (Mouridsen 1978) mit objektiven Remissionsraten zu rechnen ist.
1969 berichtete Cooper von beeindruckenden Erfolgen der Polychemotherapie beim Mammakarzinom. Unter zytostatischer Behandlung sollen bis zu 80% Remissionsraten erzielt worden sein. Dies führte zu einem Zurückdrängen endokriner Therapien des metastasierenden Mammakarzinoms gegenüber der Chemotherapie.

Es zeigte sich jedoch, daß andere Autoren (Brunner 1979) über geringere Ansprechraten der Chemotherapie (55%) berichteten. Die von Jensen (1967) erstmals geäußerte Vermutung, daß der Nachweis von Hormonrezeptoren im Mammakarzinomgewebe als Vorhersagetest für die Ansprechbarkeit hormoneller Maßnahmen geeignet ist, hat sich in der Folgezeit als klinisch bedeutsam erwiesen.

Mc Guire (1975a) bestätigte, daß mit Hilfe der Östrogenrezeptorbestimmung eine prätherapeutische Selektionsmöglichkeit für die endokrine Therapie zur Verfügung stand. Therapierte man nur Patientinnen mit rezeptorpositiven Mammakarzinomen, erzielte man eine ähnlich hohe Ansprechrate wie bei der Chemotherapie. Da die Zytostatikatherapie von erheblichen Nebenwirkungen, die die Lebensqualität der Patientinnen stark beeinträchtigen, begleitet ist, wird heute bei gleichen Therapieerfolgsaussichten der gezielten (rezeptororientierten) endokrinen Therapie der Vorzug gegeben. Durch zusätzliche Bestimmung des Gestagenrezeptors ergab sich ein weiteres Kriterium für die Therapieentscheidung. Mc Guire (1978) berichtete von Ansprechraten der endokrinen Therapie von 80% bei östrogen- und gestagenrezeptorpositiven Tumoren. Grund hierfür scheint der in Abbildung 2 gezeigte intakte Wirkungsmechanismus der Östrogenrezeptoren zu sein. Diese Ergebnisse liegen deutlich über den Erfolgen der Polychemotherapie. Für die Therapieplanung beim metastasierten Mammakarzinom ist die Bestimmung der Östrogen- und Gestagenrezeptoren im Tumorgewebe somit eine wertvolle Entscheidungshilfe.

Neben der Prädiktion des Ansprechens des Tumors auf hormontherapeutische Maßnahmen ist die prognostische Bedeutung des Rezeptornachweises von klinischem Interesse. Berichte hierüber (Knight 1977, Rich 1978, Allegra und Lippman 1980) zeigen, daß Frauen mit östrogenrezeptornegativen Mammakarzinomen ein kürzeres krankheitsfreies Interval und kürzere

Überlebenszeit zu erwarten haben als Frauen mit einem hohen Östrogenrezeptorgehalt im Tumorgewebe.
Ob außerdem eine Beziehung zwischen dem Rezeptorstatus und dem Ansprechen auf eine zytostatische Therapie besteht, ist noch nicht eindeutig geklärt. Mitteilungen, daß östrogen-rezeptornegative Karzinome am besten auf zytostatische Maßnahmen ansprechen (Lippman 1978, Jonat 1978) stehen im Widerspruch zu Befunden anderer Arbeitsgruppen (Webster 1978, Maillot 1979).
Nachdem das klar dargelegt wurde, versuchten eine Vielzahl von Autoren, Steroidrezeptoren bei zahlreichen Karzinomen des Menschen nachzuweisen.

1.5.2 Andere humane Tumoren

Das häufigere Auftreten von Nierenkarzinomen beim Mann (♂:♀ 4:1) ließ eine Hormonabhängigkeit erwarten. Nachdem Berichte über das Ansprechen fortgeschrittener Nierenkarzinome auf Medroxyprogesteron publiziert waren (Samuels 1968, Bloom 1971, 1972), versuchten mehrere Arbeitsgruppen Steroidrezeptoren in menschlichen Nieren- karzinomen nachzuweisen. Concolino (1975) berichtete über Östrogen- und Gestagenrezeptorkonzentrationen bis über 100 fmol/mg Protein. Dies ist in der Größenordnung des Rezeptorgehaltes menschlicher Mammakarzinome. Bojar (1979) hingegen zeigte mit Hilfe adäquater Untersuchungsmethoden, daß sowohl der Östrogen- als auch der Gestagenrezeptorgehalt beim menschlichen Nierenzellkarzinom sehr niedrig ist.
Auch in malignen Melanomen (Fischer 1976, Bojar et al 1982a) wurden unterschiedlich hohe Verteilungsmuster der Steroidrezeptoren beschrieben.
Ähnliches gilt für Corpus- und Cervixkarzinome (Pollow 1975, v.Maillot 1982). Bei Bronchialkarzinomen (Bojar 1982) findet man nur einen geringen Gehalt an Gestagenrezeptoren, jedoch zeigen sie hohe Glucocorticoidrezeptorkonzentrationen mit geringen Schwankungen in Abhängigkeit von der Histologie.

Veröffentlichungen über Steroidrezeptorkonzentrationen beim Ovarialkarzinom zeigen ebenfalls große Unterschiede. In Abhängigkeit von den Methoden, der Histologie und des 'cutoff' Punktes wird der Prozentsatz der östrogenrezeptor- positiven Ovarialtumoren von 45% bis 85% angegeben (Hähnel 1982, Jänne 1983, Würz 1983). Bei den Progesteronrezeptoren sind die Unterschiede noch gravierender. So berichteten Bibro (1979) von 0%, Bergquist (1981) von 40% und Galli von 55% (1981) rezeptorpositiven Ovarialkarzinomen. Friedman (1978) fand sogar in allen von ihm untersuchten Ovarialkarzinombiopsien Gestagenrezeptoren.

Berichte über Untersuchungen von Steroidrezeptoren in Hodenkarzinomen sind in der Literatur nur unzureichend vorhanden. Noltenius (1980) wies verschiedene Steroidrezeptoren mit z.T. nicht adäquaten Methoden nach.

Auch kolorektale Tumore enthalten nach einem Bericht von Sica et al. (1981) Östrogen- und Gestagenrezeptoren. In 10 von 20 Fällen findet er hochaffine Östrogenbindungsstellen mit einer Konzentration bis zu 56 fmol/mg Protein. Ebenfalls in 50% der untersuchten Fälle beschreibt er einen Gestagenrezeptor (bis zu 42 fmol/mg Protein). Die Saccharose-Dichtegratienten-zentrifugation zeigte, daß der zytoplasmatische Östrogenrezeptor der kolorektalen Tumore im 3-4,5 S Bereich lag.

Demanes (1982) analysierte in einem Leberblastom Östrogen- und Gestagenrezeptoren. Er fand einen Östrogenrezeptorgehalt von 10.5 fmol und einen Gestagenrezeptorgehalt von 62.2 fmol, beide bezogen auf 1 mg Zytosolprotein.

Insgesamt finden sich jedoch bei allen humanen Tumoren mit Ausnahme des Mammakarzinoms sehr von einander abweichende Rezeptordaten. Neben offensichtlich methodischen Schwierigkeiten einiger Arbeitsgruppen kommt als weitere Ursache für diese Diskrepanzen der geringe Probeumfang hinzu. So berichteten Keshgegian und Wheeler (1980) über den Nachweis von Östrogenrezeptoren bei malignem Carcinoid anhand von zwei Fällen.

1.6 Problemstellung

1.6.1 Instabilität des Rezeptorproteins

Zytosolische Steroidrezeptoren sind sehr instabil. Bei der Lagerung von Geweben bei -80°C nimmt die Bindungskapazität (Geyer 1982) nach etwa 3 Monaten auf etwa 60% der Ausgangskapazität ab. Bei Raumtemperatur sinkt die Bindungsaktivität innerhalb weniger Stunden ab. Hierfür gibt es zwei Hauptgründe: 1. die Thermolabilität des Rezeptorproteins und 2. Proteasenaktivitäten. Praktisch sind jedoch diese beiden Punkte nicht zu trennen.
Aufgrund dieser Tatsachen war es bisher nicht möglich, kontrollierte Steroidrezeptoranalysen durchzuführen. Alle bisher durchgeführten Rezeptoruntersuchungen sind deshalb nur bedingt vergleichbar. Das verschicken von tiefgefrorenen Mammakarzinomgewebe (Wittliff 1979) auf Trockeneis als Qualitätskontrolle war aufgrund technischer Probleme und der Heterogenität des Tumormaterials ungeeignet.
Erste Fortschritte wurden durch die Entwicklung von thermostabilem, lyophylisiertem Kalbsuterusgewebe erzielt (Bojar 1980). Zur Herstellung eines Standards mußte dieses jedoch noch extrahiert und ultrazentrifugiert werden, so daß eine routinemäßige Kontrolle mit diesem Pulver umständlich war.
Hieraus ergab sich die Notwendigkeit einen Standard zu entwickeln, der durch einfaches Auflösen zu erhalten ist. Dies gelang durch Lyophylisieren bestimmter Zytosolpräparationen aus Kalbsuterusgewebe.

1.6.2. Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist der häufigste bösartige Tumor der Frau. Nach Einführung des Rezeptorkonzepts durch Jensen (1969) gelang die prätherapeutische Selektion der auf endokrine Maßnahmen ansprechende Tumoren nur bedingt. Ein wichtiger Grund hierfür liegt darin, daß die Rezeptoranalytik methodisch problematisch ist. So sprachen nur 63% der östrogenrezeptor-positiven Tumoren laut Jensen und DeSombre (1977) an. McGuire et al. (1977) beobachteten in 60% der von ihnen untersuchten rezeptorpositiven Tumoren eine Remission nach der endokrinen Therapie. Rosen et al. (1977) berichteten über entsprechende Therapieerfolge bei 68% der rezeptorpositiven Patientinnen. Die Korrelation zwischen dem Rezeptorbefund und dem Erfolg der endokrinen Therapie ist also nicht absolut. Außerdem wurde beobachtet, daß 8% der östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinome nach der empirischen Hormontherapie Remissionen aufwiesen (McGuire et al., 1975a). Wittliff (1974) verzeichnete bei 5 von 80 rezeptornegativen Tumoren Remissionen nach Einsatz der endokrinen Therapie.
Obwohl diese Beobachtungen nicht zwingend auf Fehler bei der Rezeptoranalytik zurückzuführen sind, liegt der Verdacht nahe, daß methodische Unzulänglichkeiten für diese Diskrepanzen oder scheinbaren Widersprüche mitverantwortlich sind.
Gegenstand meiner Arbeit war zunächst die Entwicklung eines computergesteuerten Rezeptoranalyseautomatens und die Weiterentwicklung eines thermostabilen Rezeptorstandards. Durch beide Entwicklungen waren wir weltweit erstmals in der Lage, über mehrere Jahre Rezeptoranalysen mit gleichbleibend hohem Standard durchzuführen. Als Mitarbeiter in einem theoretischen Institut hatte ich nicht die Möglichkeit, klinische Korrelationen zu untersuchen, aber es war erstmals möglich, eine Reihe von theoretischen Fragestellungen abzuklären.
Berücksichtigt man, daß das Mammakarzinom eine sehr heterogene

Erkrankung ist, können sich erst aus großen Fallzahlen Klarheiten über bestimmte Zusammenhänge bzw. Abhängigkeiten ergeben. Bei einer derartig aufwendigen Analytik sind jedoch zahlreiche Fehlermöglichkeiten gegeben. Besonders bei großen Serien und wechselndem Personal sind Auswertungen über einen längeren Zeitraum kritisch. Erst durch standardisierte und kontrollierte Methoden ist eine statistische Auswertung möglich. Durch die Entwicklung eines Autoanalysers war es erstmals möglich, einen gesicherten Methodenvergleich durchzuführen.
Außerdem konnte die Korrelation zwischen Östrogenrezeptor und Gestagenrezeptor untersucht werden und dadurch geklärt werden, ob es wirklich einen positiven Gestagenrezeptorbefund bei östrogenrezeptornegativen Tumoren gibt. Darüberhinaus waren genügend Daten zur Klärung des sogenannten "Rezeptorwechsels" zu erwarten. So berichtete Jonat (1982) u.a. über rezeptorpositive Metastasen bei rezeptornegativem Primärtumor. Nur der ebenfalls aufgeführte umgekehrte Fall ist durch Differenzierungsverlust bei der Metastasierung zu erklären. Auch konnten Rezeptorkonzentrationsschwankungen in Abhängigkeit von der Jahreszeit und des Patientenalters ermittelt werden.

1.6.3 Tumore der Keimorgane, des Kolons und der Leber

Während beim Mammakarzinom das Vorhandensein von Steroidrezeptoren und deren Bedeutung für das Wachstum unumstritten sind, werden über Rezeptorgehalt und dessen Bedeutung bei allen anderen Tumorformen kontroverse Diskussionen geführt. So berichtete Friedman (1978) über 34 von 34 gestagenrezeptorpositiven Ovarialkarzinomen; Bibro (1979) bezeichnete alle 29 von ihm untersuchten Ovarialtumorbiopsien als gestagenrezeptornegativ.
Durch kontrollierte Analysen von 68 Ovarialkarzinombiopsienm mit adäquaten Methoden war es zum ersten Mal möglich, die Höhe

und Verteilung des Östrogen- und Gestagenrezeptorgehaltes sowohl in Primärtumoren als auch in Mestasen zu ermitteln. Darüber hinaus konnte untersucht werden, ob der Menopausenstatus einen Einfluß auf den Rezeptorstatus ausübt. Aufgrund der Rezeptordaten von Ovarialkarzinomen war zu erwarten, daß auch männliche Keimdrüsenorgane Steroidrezeptoren aufweisen. Noltenius (1980) berichtete u.a. über Untersuchungen von Östrogen-, Gestagen- und Androgenrezeptoren beim Hodenkarzinom. Er konnte weder Androgen- noch Gestagenrezeptoren nachweisen, fand aber bei der Hälfte seiner untersuchten Hodenteratome Östrogenrezeptoren bis zu 69 fmol/mg Zytosolprotein. Diese Ergebnisse galt es zu überprüfen. Es lag nahe, darüber hinaus die männlichen Keimdrüsenkarzinome auf Androgen- und Glucocorticoidrezeptoren zu untersuchen. Bei den kolorektalen Karzinomen war die Frage zu klären, ob die von Sica (1981) beschriebenen Steroidrezeptorgehalte verifiziert werden können. Klinische Hinweise, die auf einen Zusammenhang von Östrogentherapie und dem Auftreten von fokal-nodulären Leberhyperplasien hindeuten, werden in der Literatur heftig diskutiert. Durch Nachweis von Östrogenrezeptoren und eines Org 2058-Binders gelang es, mögliche molekulare Zusammenhänge aufzuzeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Humane Tumoren

A. Die untersuchten Mammakarzinome stammten aus ca. 100 verschiedenen Krankenhäusern. Die Gewebsentnahmen wurden in den angeschlossenen Kliniken nach einem einheitlichen Protokoll durchgeführt. Direkt nach der Entnahme mußte der Tumor von Begleitgewebe (Fett und Bindegewebe) weitgehendst befreit werden und auf $0^{\circ}C$ heruntergekühlt werden. Nach Befundung durch einen Pathologen wurde das Probenmaterial auf Trockeneis in einem Spezialtransportbehälter zur Onkologischen Chemie gesendet. Eine Zwischenlagerung, nicht länger als 14 Tage, erfolgt bei $-90^{\circ}C$. Durch Voruntersuchungen war sichergestellt worden, daß unter diesen Bedingungen kein meßbarer Rezeptorverlust auftrat.

B. Die untersuchten Ovarialkarzinome stammten aus fünf Kliniken Düsseldorfs. Die Ovarialbiopsien wurden wie oben unter Punkt A beim Mammkarzinom beschrieben, aufbereitet und versandt.

C. Kolorektale Karzinome wurden uns von dem Onkologischen Zentrum der Klinik der Stadt Mannheim zur Verfügung gestellt. Auch die kolorektalen Karzinome wurden direkt nach Entnahme tiefgefroren und ohne längere Zwischenlagerung der Rezeptoranalytik zugeführt. Gewebeaufbereitung und Gewebetransport erfolgten wie oben beschrieben.

E. Die untersuchten Hodentumoren stammten aus der Urologischen Universitätsklinik der Stadt Bonn.

F. Die analysierten Lebertumoren erhielt ich aus dem Operationsgut der Klinik für Abdominal- und Transplantationschirugie der Medizinischen Hochschule Hannover.

2.2 Chemikalien, Radiochemikalien und Scintillatoren

(6,7-^{3}H)-Östradiol-17ß (spez.Aktivität 41-49 Ci/mmol), (17a-Methyl-^{3}H) Promegeston (R5020)(87 Ci/mmol), 16a-äthyl-21-hydroxy-19-norI6,7-[^{3}H]pregn-4-ene-3,20dione) (Org 2058) (54Ci/mmol),(1,2-^{3}H)Dexamethason(20 Ci/mmol),(17a-methyl-3,17ß-hydroxy-17methyl-estra-4,9,11-triene-3 -one) (methyltrienolone, R 1881) (87 Ci/mmol)
Hersteller: New England Nuclear (NEN) bzw. Amersham Buchler
Nicht markiertes R5020 und R1881 stammte von NEN, Diäthylstilböstrol (DES) von Merck, Darmstadt, Dexamethason von Calbiochem. Biofluor stammte von New England Nuclear. Norit A wurde von Serva bezogen, Dextran T500 von Pharmacia. Partigen M-Platten stammten von Behring, Marburg,
Human-Serumalbumin-Proteinstandard von Kabi.
Alle übrigen Chemikalien waren handelsübliche Präparate der Klassifikation p.a.

2.3 Hormonrezeptornachweis

Zum Nachweis von Steroidhormonrezeptoren sind verschiedene Methoden möglich. Alle etablierten Methoden bedienen sich radioaktiv markierter Steroidhormone und weisen die Rezeptoren in Zytosol nach. Zur Zytosolherstellung wird das tiefgefrorene Tumorgewebe unter Kühlung durch flüssigen Stickstoff mit einem Mikro-Dismembrator (Braun-Melsungen AG) 45 Sekunden pulverisiert. Anschließend wird das Gewebepulver bei 0^{o}-3^{o}C mit folgendem Puffer extrahiert (Verdünnung: 1:4 bis 1:7, w/v): 0.01 mol/1 K_2HPO_4/KH_2PO_4, 0,0015 mol/1 Na_2EDTA, 0,003 mol/1 NaN_3, 0,01 mol/1 Monothioglycerol, 10% (v/v) Glycerin (Extraktionspuffer, pH 7,4). Nach 45minütiger Zentrifugation bei 105 000 x g (Beckman L8-80 Ultrazentrifuge) wird der Überstand (Zytosol) mit einer Pasteur-Pipette entnommen und bis zur weiteren Verwendung mit Eis gekühlt.

2.3.1. Mehrpunkt-Dextrankohleassay

Beim Mehrpunkt-Dextrankohleassay wird Tumorzytosol zur Bestimmung der totalen Hormonbindung mit steigenden Konzentrationen der radioaktiven Steroidhormone ((^{3}H)17ß-Östradiol 0,3 - 5 nmol/l, (^{3}H) R5020 bzw. Org2058 0,5 - 10 nmol/l)) wenigstens 3 Stunden bei 0-3°C inkubiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung werden für jede Konzentration des tritiummarkierten Steroids Parallelansätze mitgeführt, die zusätzlich zum radioaktiven Hormon einen mindestens 100fachen Überschuß an unmarkiertem Steroid enthalten. In diesen Parallelansätzen wird durch das nicht radioaktive Hormon eine so hohe Isotopenverdünnung (Abnahme der molspezifischen Aktivität) des tritiummarkierten Steroids herbeigeführt, daß in Anbetracht der geringen Hormonbindungskapazität (niedrige Rezeptorkonzentration) der Zytosole eine Bindung des radioaktiven Steroids an Rezeptoren nicht mehr meßbar ist. Die Differenz zwischen der totalen und unspezifischen Bindung wird als spezifische Bindung (Rezeptorbindung) bezeichnet. Dextrankohle wird am Ende der Inkubationszeit zur Abtrennung des freien und mit geringer Affinität unspezifisch an verschiedene Proteine gebundenen Steroids von den hochaffinen (^{3}H)Hormon-Rezeptorkomplexen verwendet. Die Ermittlung der scheinbaren Dissoziationskonstanten und der maximalen Bindungskapazität wird dann nach der Methode von Scatchard (1949) durchgeführt. Für den Mehrpunkt-Dextrankohleassay wurde der in 2.6. näher beschriebene Analysen- und Auswerteautomat entwickelt.

2.3.2. Saccharose-Gradientenzentrifugation

Der Mehrpunkt-Dextrankohleassay ist sicher das einfachste Verfahren zur Steroidrezeptorbestimmung in Tumorzytosolen. Wegen der Möglichkeit, maximale Bindungskapazitäten zu errechnen, liegen die durch diesen Assay ermittelten

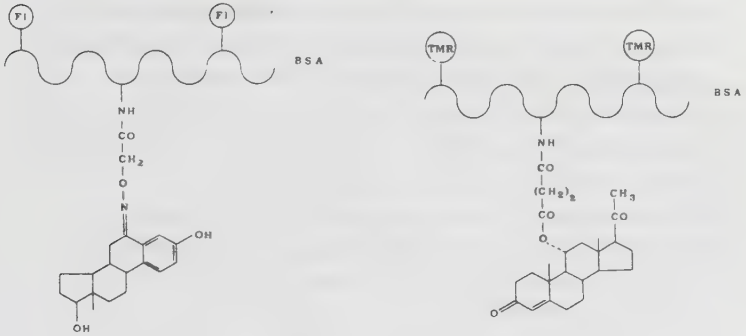
Rezeptorkonzentrationen etwas höher als beim Rezeptorassay mittels Dichtegradientenzentrifugation. Allerdings hat der Mehrpunkt-Dextrankohleassay einige Nachteile gegenüber der Gradientenzentrifugation. Artefakte durch unspezifische (Nicht-Rezeptor-)Bindung sind nicht so einfach wie bei der Zentrifugationstechnik erkennbar (Jensen 1977). Der Mehrpunktassay kann nicht zwischen der 8-9 S und 4-5 S Form der Rezeptorkomplexe differenzieren, eine Unterscheidung, die von einigen Autoren beim Östrogenrezeptor (Wittliff 1977) und Gestagenrezeptor (McGuire 1979) für wichtig gehalten wird. Ein weiterer Vorteil ist der geringe Bedarf an Tumormaterial (ca. 100 mg) für die Gradientenzentrifugation im Vergleich zur Mehrpunkt-Scatchard-Bestimmung (ca. 200-300 mg). Ein wesentlicher Nachteil der klassischen Gradientenzentrifugation mit Schwingbecherrotoren ist der Zeitaufwand von 16 - 18 Stunden, der zur Trennung der Rezeptorformen notwendig ist. Inzwischen ist mit den Beckman-Vertikalrotoren eine Rotorgeneration entwickelt worden, die extrem kurze Trennzeiten ermöglicht. Mit der L8-80 Ultrazentrifuge und dem Vertikalrotor VTi-80 (maximale Drehzahl 80 000 min^{-1} und einem wt^2 von $3{,}4 \times 10^{11}$) wurden die beiden Steroidrezeptorformen jetzt in etwa 2 Stunden voneinander getrennnt.

2.3.3 Histochemische Untersuchungen

A. Untersuchungen an Gefrierschnitten

Die Analysen wurden mit verschiedenen Steorid-Albuminkonjugaten an 8-10 um Gefrierschnitten durchgeführt, die mit einem Leitz-Kryostaten (Typ 1720) hergestellt worden waren. Die verschiedenen Schnitte inkubierte ich nach der Methode von Lee (1978).

Abb. 3 zeigt die Struktur der direkt von Lee bezogenen Präparate.



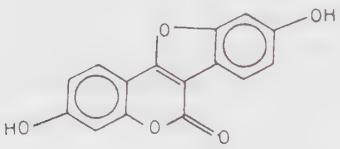
Untersucht wurden Schnitte aus Kalbsuterusgewebe, rezeptorpositive und -negative Mammakarzinome (bestimmt durch Dextrankohleassay und Gradientenzentrifugation). Kompetitionsuntersuchungen wurden durchgeführt durch Vorinkubation mit 1 umol/l Diäthylstilböstrol und/oder Beimischung des Kompetitors zu den Fluoreszenz-Steroid-Albuminderivaten.

B. Untersuchungen mit Coumestrol

Coumestrol, eine zu den Isoflavonen gehörende Substanz, besitzt östrogene Eigenschaften. Da es zusätzlich bei einer Anregung von 240 nm eine Eigenfluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 400 nm zeigt, habe ich versucht, diese Substanz für Rezeptoranalysen zu verwenden. Zwei Möglichkeiten wurden untersucht. 1. Untersuchung an Gefrierschnitten: Dazu wurden 8-10 um Schnitte 90 min bei Raumtemperatur mit verschiedenen Coumestrolkonzentrationen inkubiert, danach vorsichtig mit Puffer (s. 2.3.) gewaschen und anschließend die Fluoreszens mikroskopisch beurteilt. Zur Hemmung der Rezeptorbindung und zum Nachweis der unspezifischen Bindung

wurde der benachbarte Schnitt mit einem 1000-fachen Überschuß an Diäthylstilbestrol inkubiert. Als möglichen zweiten Weg wurde Kalbsuteruszytosol mit steigenden Konzentrationen Coumestrol (1-1000 nmol/l) inkubiert und der Überschuß des nicht gebundenen Pflanzenöstrogens mit Dextrankohle abgetrennt.
Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung wurden zusätzlich pro Ansatz Diäthylstilböstrol (1 umol/l) hinzugegeben. Die Überstände wurden fluoreszensphotometrisch bei 340 nm Anregungswellenlänge untersucht. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge = 400 nm.

Abb. 4 zeigt die Strukturformel von Coumestrol.



2.3.4. Bezugssystem

Die maximale Steroidbindungskapazität bzw. Rezeptorkonzentration wird zumeist auf mg Zytosolprotein und nur von wenigen Arbeitsgruppen auch auf mg DNA bezogen. Bei allen untersuchten Tumoren wurde das Zytosolprotein als Bezugsgröße verwendet. Die Proteinbestimmung wurde unter Verwendung des KABI-Humanserumalbumin-Proteinstandards nach der Methode von Lowry (1951) durchgeführt. Dabei ist zu berücksichtigen, daß das Monothioglycerin (aus dem Extraktionspuffer) gleichfalls

eine positive Farbreaktion gibt und deshalb entsprechende Leerwerte mitgeführt werden müssen. Das ermittelte Gesamtprotein wird anschließend um den Serumproteinanteil korrigiert. Der Gehalt des Tumorzytosols an Serumprotein wird rechnerisch aus dem in jedem Zytosol immunologisch bestimmten Albuminanteil (M-Partigen-Albumin-Immundiffusionsplatten, Behring Institut) ermittelt.

2.4 Qualitätskontrolle

Durch Entwicklung eines temperaturstabilen und leicht zu handhabenden Referenzpulvers konnte eine tägliche Kontrolle der Rezeptoranalytik durchgeführt werden. Das Ausgangsmaterial dazu waren Uteri von 6-8 Monate alten Kälbern. Aus jeweils 8-10 Uteri wurden 500 ml Zytosol (s. 2.3) hergestellt. Je 5 ml des eiskalten, frischgewonnenen Materials wurden in 20 ml braune Glasfläschchen überführt und in einem Christ DELTA IA Lyophilisator gefriergetrocknet. Nach 72 Stunden betrug die Restfeuchtigkeit o,1 o/oo, bei 10^{-3} Torr. Die unter Vakuum verschlossenen Gefäße wurden anschließend bei $4^{o}C$ gelagert.
Zur späteren Analyse wurde das Lyophilisat in 5 ml eines Gemisches aus destilliertem Wasser und Glycerin (5%) gelöst und mittels einer Pasteurpipette gut durchmischt. Als Standardwert eines Batches wurde der Durchschnittswert von fünf Analysen ermittelt. Eine Reanalyse nach 4 Monaten ergab keine signifikante Abnahme des Rezeptorgehaltes der gelagerten Proben. Die Ergebnisse der täglich durchgeführten Qualitätskontrollen sind in 3.2 dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Entwicklung des Analysesystem

Die Steroidrezeptoranalysen müssen aufgrund der Thermolabilität der Rezeptorproteine bei 0-4°C durchgeführt werden. Das Arbeiten in einer Kühlkammer bzw. an einer Kühltheke bringt gesundheitliche Risiken mit sich. Außerdem führen das ständige Arbeiten in der Kälte und die zahlreichen Einzelpipettierungen zwangsläufig zu Fehlern in dem Assay. Weiterhin beinhaltet der Umgang mit den radioaktiven Hormonen zusätzliche eine Kontaminationsgefahr für das technische Personal.
Aus diesen Gründen entschlossen wir uns 1979 zur Entwicklung eines automatischen Analyse- und Auswertesystems.
Kommerziell war kein Gerät erhältlich und es konnte auch nicht erwartet werden, daß in absehbarer Zeit ein für die Rezeptoranalytik brauchbarer Analysenautomat auf den Markt gekommen wäre, da die befragten, potentiellen Hersteller eine Entwicklung für zu aufwendig und kostspielig erachteten. Auch hielten sie die zu erwartende Nachfrage auf dem Markt für zu gering.

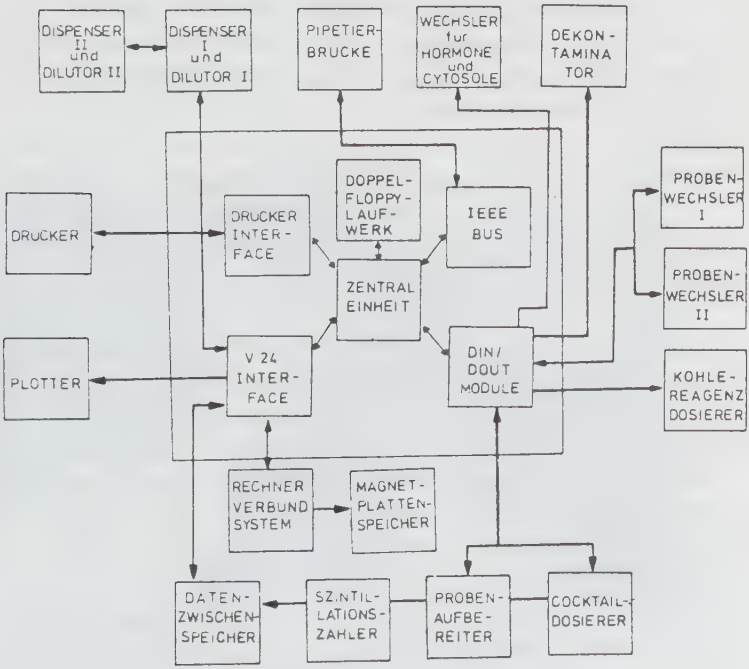
3.1.1. Wahl des Rechners

Als DV-Hardware für die Rezeptorstraße wurde eine MINC 11 von Digital Equipment ausgewählt. Es handelt sich um einen speziellen Laborcomputer, der analoge und digitale Eingabesignale verschiedener Frequenzen empfangen und verarbeiten kann. Der Rechner besitzt drei serielle Eingänge, je ein Modul mit 16 digitalen Ein- bzw. Ausgängen und einen IEEE-488-Instrumentenbus.
Optionel sind A/D bzw. D/A Wandler, analoge Multiplexer,

Vorverstärker und eine programmierbare Echtzeituhr (mit Schmitt-Trigger).
Durch diese Bausteine ist der MINC 11 in idealer Weise für Prozeßsteuerung und Datenaufnahme bzw. -verrechnung geeignet. Das MINC-Terminal (VT 105) hat sowohl alphanumerische als auch graphische Funktionen mit 510 horizontalen und 240 vertikalen Positionen. Daten können graphisch im Punkt- oder Histogrammodus dargestellt werden.

3.1.2 Beschreibung der Gerätekonfiguration

Abb. 5 zeigt ein Blockdiagramm der Gerätekonfiguration.



Die Zentraleinheit ist eine LSI-11/23 mit einem Arbeitsspeicher von 128 K-byte.

Aufgrund der Thermolabilität der Steroidrezeptoren müssen sämtliche Pipettierschritte in der Kälte durchgeführt werden (0^{o}-4^{o}C). Die Kühlung des Arbeitsbereiches wird durch ein Bosch-Kälteaggregat (Typ 0707, Kälteleistung 420 kcal/h) gewährleistet.
Der Wechsler für Hormone und Zytosole besteht aus einer drehbaren Einheit, die verschiedene Teflonscheiben aufnehmen kann. Im ersten Arbeitsgang wird eine Scheibe mit 8 Bohrungen eingesetzt, in denen sich die radioaktiven und nichtradioaktiven Hormone, neben einer Dekontaminationslösung, befinden. Kontrolliert über das digitale Eingabe/Ausgabe Modul wird zunächst das erste radioaktive Hormon in Position gebracht. Bei diesem Vorgang kann die Scheibe, angetrieben durch einen Drehstrommotor mit Getriebe und elektromagnetischer Bremse, zwölf Stellungen einnehmen.
Die Pipettierbrücke wird durch den IEEE-Bus gesteuert. Sie hat einen Verfahrbereich in der Horizontalen von 600 mm und in der Vertikalen von 100mm. In diesem Bereich kann jede beliebige Stelle mit einer Positioniergenauigkeit = 1mm angefahren werden. Über eine V-24 (RS 232) Schnittstelle werden der Dispenser/Dilutor I und II angesteuert. Es handelt sich um je einen MICROLAB M der Firma Hamilton. Sie können mikroprozessorgesteuert verdünnen, dosieren oder pipettieren. Auf dem Probentisch werden in einer Kette die Eppendorf Reaktionsgefäße positioniert. Die Kontrolle erfolgt über das digitale Eingabe/Ausgabe Modul. Nach der Übertragung von bis zu sechs steigenden Hormonkonzentrationen fährt die Brücke den Pipettierkopf zum Dekontaminator. Hier werden die Pipettierspitzen sowohl von innen als auch von außen gespült. Der Kettenvorschub wird ebenfalls über digitale Eingabe- und Ausgabe Module gesteuert.

Nach Zytosolübertragung, Inkubation und anschießender Kohletrennung erfolgt die Übertragung der radioaktiven Überstände in entsprechende Szintillationsgefäße. Gleichfalls wird, ebenfalls rechnergesteuert, den Überständen mit Hilfe des Cocktaildosierer Szintillationslösungen beigemischt.
Die anschließende Radioaktivitätsbestimmung erfolgt in einem Beckman LS 9000 Szintillationszähler. Dazu kann die Kette des Probenaufbereiters durch einen Verbindungsschacht gegen die des Zählers ausgetauscht werden.
Die Daten der Radioaktivitätszählung werden 'on line' in einen Zwischenspeicher (Kapazität 48K-byte) übertragen. Von dort können sie jeder Zeit über eine V-24 Schnittstelle vom Zentralrechner übernommen und ausgewertet werden. Nach graphischer Darstellung werden die vom Operator überprüften Analysedaten den zugehörigen Patientendaten zugeordnet und auf den 2-Mega-Byte Diskettenspeicher übertragen. Als Datenausgabegerät fungieren ein Drucker und ein Plotter (TEWI DATA Typ 281, Eingangspuffer 18K-byte).
Die beschriebene Anlage ist auf dem Foto in Abbildung 6 zu sehen.

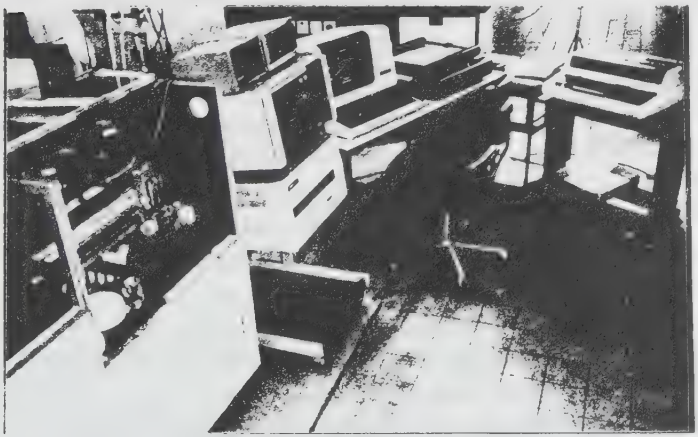


Abb. 6 zeigt den Analysenautomaten in einer Teilansicht. Im Vordergrund ist die Pipettiereinheit, im Hintergrund die Auswerte- und Ausgabeeinheit zu sehen.

3.1.3 Beschreibung der Software

Sowohl die Steuer- als auch die Auswerte-Software wurden in der höheren Programmsprache BASIC geschrieben.
Das erste Programm verwaltet die Patienten- und Labordaten. Hierzu gehören Name, Vorname, Geburtsdatum, Operationsdatum und die einsendende Klinik. Weiterhin werden Daten, die das Tumorleiden der Patienten betreffen, eingegeben. Diese Daten beinhalten das TNM-Schema, die Histologie und die vorausgegangene Therapie. Die TNM-Klassifikation beinhaltet Angaben über T=Primärtumor, N=regionäre Lymphknoten und M=Fernmetastasen.
Zu den Labordaten zählen u.a. mol- und volumenspezifische Aktivität der eingesetzten Hormone. Das Programm überprüft den Titrationsbereich und gibt in Abhängigkeit der Patientenzahlen die Volumina der benötigten heißen und kalten Hormone an. Anschließend wird interaktiv die Startbereitschaft des Analyseautomaten überprüft. Hierzu veranlaßt der Computer den Operator die Reagenzien zu überprüfen, die Arbeitstemperatur zu kontrollieren und fragt, ob die Reaktionsgefäße in Startposition gefahren sind. Im Anschluß hieran wird das Steuerprogramm I geladen.
Steuerprogramm I kontrolliert die Pipettierung der radioaktivmarkierten und -unmarkierten Hormone und die anschließende Zytosoldosierung. Die Pipettierbrücke wird dabei über den IEEE-Instrumentenbus gesteuert. Das Wechseln der Hormone- und Probenröhrchen sowie die Dekontamination erfolgt über die digitalen Eingabe/Ausgabe Module. Die Dispenser/Dilutoren werden über ein V-24 Schnittstelle angesteuert. Das Steuerprogramm II steuert und überwacht das Übertragen radioaktiver Überstände und die Szintillatorbeimischung, d.h. die Vorbereitung der Proben zur radioaktiven Auswertung. Die in diesem Programm zu steuernden Einheiten (Cocktaildosierer, Probenaufbereiter) werden ebenfalls durch die digitalen Eingabe/Ausgabe Module kontrolliert. Mit

Hilfe eines Datenübernahmeprogrammes werden die Zähldaten der Radioaktivitätsbestimmung auf den Diskettenspeicher übertragen und dort den entsprechenden Patienten zugeordnet.
Das Auswerteprogramm I verrechnet die ermittelten Daten. Dazu werden noch die Ergebnisse der Proteinbestimmung als Bezugsgröße eingegeben.
Die Auswertung geht von folgenden Grundlagen aus: Die Titration der Bindungsstellen geschieht in zwei Schritten. Zuerst wird die totale Bindung eines tritiierten Steroidhomons nachgewiesen. Anschließend erfolgt die Bestimmung der Restbindung nach Kompetition mit einem mindestens hundertfachen Überschuß an kaltem Hormon.

Ausgehend von der Voraussetzung, daß immer nur ein Steroidmolekül pro Rezeptor gebunden wird, verhält sich die Bindung entsprechend den Massenwirkungsgesetz wie folgt:

$$\begin{array}{ccccc} \text{(Hormon)} & + & \text{(Rezeptor)} & \rightleftharpoons & \text{(Hormonrezeptorkomplex)} \\ \text{(H)} & + & \text{(R)} & \rightleftharpoons & \text{(HR)} \end{array}$$

Die apparente Assoziationskonstante (K_a) und die apparente Dissoziationskonstante (K_d) ergeben sich dann aus folgender Gleichung:

$$Ka = \frac{[R\,H]}{[R]\quad[H]} = \frac{1}{Kd}$$

Die Affiniät des Hormons zum Rezeptor und die Bindungskapazität lassen sich ermitteln, indem man die spezifische Bindung in Abhängigkeit von der Hormonkonzentration mißt. Die sich daraus ergebende Sättigungskurve ist ungünstig für die Analyse der Bindungsdaten.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Reaktionsgleichung als Geradengleichung wiederzugeben, eine davon ist die Methode nach Scatchard (1949), auf den folgenden Seiten auch Scatchard-Plot genannt.

Das Massenwirkungsgesetz für die Hormon-Rezeptor-Reaktion

$$\frac{[R\ H]}{[R]\quad[H]} = Ka$$

läßt sich folgendermaßen umformulieren:

$$\frac{[R\ H]}{[H]} = -Ka[R\ H] + Ka[R_o]$$

RH : spezitisch gebundenes Hormon, meßbare Größe

H : H_o - RH, freies Hormon

H_o = eingesetztes Hormon (meßbar)

R : R_o - RH, freier Rezeptor

R_o = Rezeptorkonzentration, soll ermittelt werden

Aus obiger Gleichung ergibt sich durch Einsetzen:

$$\frac{[R\ H]}{[H]} = Ka[R]$$

Dieser Ausdruck entspricht der allgemeinen Geradengleichung. Die Rezeptorkonzentration R sowie die Affinität des Hormons zum Rezeptor läßt sich mittels dieser Geradengleichung bestimmen (Abb. 7).

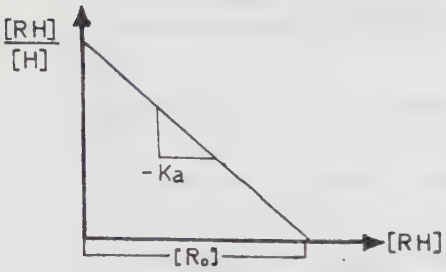


Abb. 7
Graphische Ermittlung der Assoziationskonstanten K_a und der Rezeptorkonstanten R_o nach Scatchard

Für sehr hohe Hormonkonzentrationen strebt der Wert $\frac{[RH]}{[H]}$ gegen Null, der Schnittpunkt der x-Achse entspricht der Gesamtrezeptorkonzentration $[R_o]$, ausgedrückt in mol/l. Die Dissoziationskonstante K_d berechnet man aus dem Verhältnis Abszisse/Ordinate, ebenfalls ausgedrückt in mol/l.

Zur Auswertung einer Analyse werden zuerst die eingesetzten Aktivitäten auf dem graphischen Terminal dargestellt. Der Operator kann nun den Titrationsbereich kontrollieren. Anschließend wird für jeden Tumor sowohl die totale als auch die nichtspezifische Bindung eines Hormones aufgetragen.
Abbildung 8 zeigt eine für Steroide typische Bindungskurve. Die durchgezogene obere Linie entspricht der totalen Bindung, die punktierte Gerade entspricht der nichtspezifischen Bindung. Als Differenz ergibt sich eine typische Sättigungskurve.

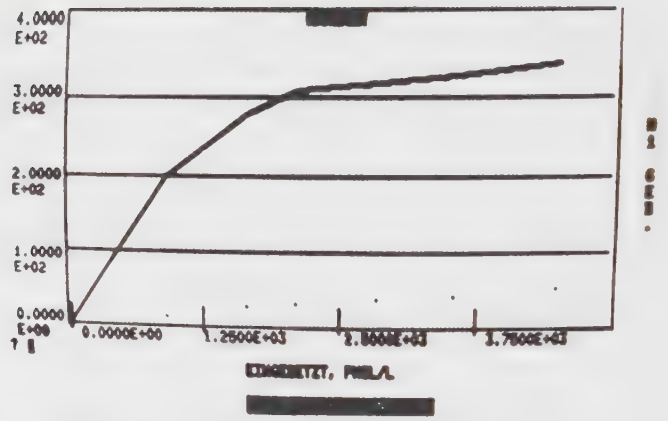


Abb.8 zeigt die Terminaldarstellung einer typischen Steroid-Bindungskurve. (-) = Totale Bindung (..) = nichtspezifische Bindung.

Falls die Bindungskurve auf einen rezeptorpositiven Tumor hindeutet, kann der Benutzer eine Auswertung nach Scatchard abrufen.
Bevor der Rechner die ermittelte K_d und die maximale Bindungskapazität den Patientinnendaten zuordnet, besteht die Möglichkeit, einzelne offensichtliche Fehlmessungen zu korrigieren bzw. aus der Berechnung zu eliminieren.
Ein Photo der graphischen Terminaldarstellung zeigt Abbildung 9.

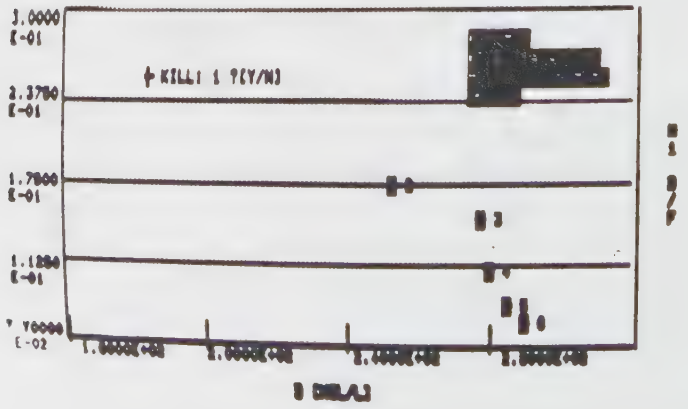


Abb. 9 zeigt die Terminaldarstellung einer Scatchard-Auswertung.

REZEPTORSTATUS

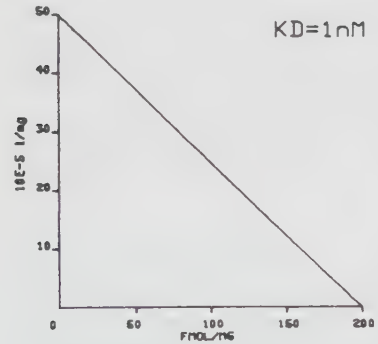
18-APR-83

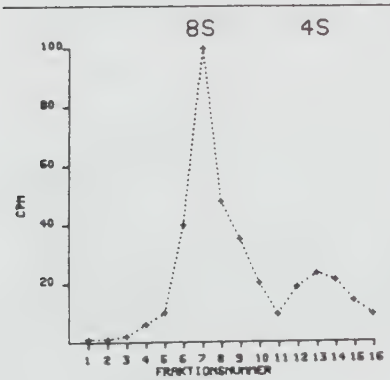
NAME : **********
VORNAME : *****
GEB. DAT. : 03-08-13

TAGEBUCHNR. : 300
OP-DAT. : 02-83
HAGEN, ST. JOSEFS-HOSPITAL

ÖSTROGENREZEPTOR

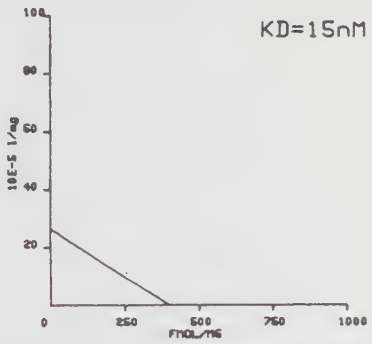
KONZENTRATION: 199 FMOL/MG
8S-REZEPTOR : 80 %





GESTAGENREZEPTOR

KONZENTRATION: 397 FMOL/MG
8S-REZEPTOR : 70 %



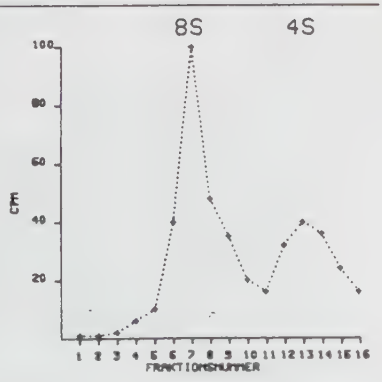


Abb. 10 zeigt einen ausgeplotteten, kompletten Rezeptorbefund.

Das Auswerteprogramm II übernimmt aus einem zweiten Datenzwischenspeicher die Radioaktivitätszählungen der Gradientenzentrifugation. Diese werden dann ebenfalls den Patientendaten zugeordnet und mit ausgeplottet (siehe Abbildung 10).
Neben den erwähnten Steuer- und Auswerteprogrammen sind kleinere Testprogramme zur Überprüfung der einzelnen Funktionseinheiten entwickelt worden. Durch Testen der Einzelgeräte kann ein Fehler innerhalb der komplexen Gerätekonfiguration schnell lokalisiert werden.

3.1.4 Funktion

Wenn das Tumormaterial in ausreichender Menge vorhanden ist, wird eine Östrogen- und Gestagenrezeptortitration mit je sechs verschiedenen Hormonkonzentrationen durchgeführt. Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung werden zusätzlich sechs Werte mit einem Überschuß an kalten Hormonen pipettiert. Im einzelnen geschieht das wie folgt:

Der Pipettierkopf wird zum Wechsler gefahren. Die erste Pipettierspitze taucht in den radioaktiven Östrogenstock, die zweite in eine Spülflüssigkeit ein. Die Eintauchtiefe wird in Abhängigkeit der verbrauchten Flüssigkeitsmenge variiert. Über den ersten Schlauch werden nun 2 µl radioaktives Östrogen aufgenommen, welches mit 18 µl 20%igem Äthanol aus einem Vorratsgefäß verdünnt wird. Im Anschluß daran wird der Pipettierkopf zum Probentisch gefahren, wo 20 µl der ersten Konzentration abgegeben werden. Durch Variationen der Ansauge- bzw. Auffüllmengen werden sechs steigende Hormonkonzentrationen übertragen. Dann wird die Wechslerscheibe gedreht und es werden zusätzlich über die zweite Pipettierspitze nichtradioaktive Hormone im 100fachen Überschuß übertragen.
Die 6-Punkt-Scatchardanalyse umfaßt dabei für jedes Hormon

also 18 Einzelpipettierschritte in 12 Reaktionsgefäße. Die Maschine braucht hierfür 9 Minuten. Da in jeder Biopsie nach Möglichkeit beide oben genannten Rezeptoren titriert werden, benötigt die Maschine für den ersten Schritt der Analyse 18 Minuten pro Tumorextrakt. Die Hormone werden hierfür nach gleichem Prinzip pipettiert. Sie werden dazu rechnergesteuert im Wechsler in Position gebracht. Für den anschließenden Schritt der Zytosolübertragung werden nur 2 Minuten benötigt. Hierzu wird der Hormonwechsler durch die Zytosolwechselpalette ersetzt. Mit Hilfe der 5 ml - Probenspritze des MICOLAB M kann die Zytosolmenge für einen Assay auf einmal aufgenommen und anschließend in die 24 Reaktionsgefäße dosiert werden. Nach Inkubation über Nacht wird die Reaktion automatisch gestoppt. Auf dem Probentisch II wird hierzu jedem Reaktionsansatz 200 µl Kohlereagenz zugemischt. Dabei werden die Deckel der Reaktionsgefäße mit einer Nadel durchstochen; durch die das Reagenz injiziert wird. Dieser Arbeitsvorgang dauert etwa drei Minuten pro Doppelanalyse.
Nach der Zentrifugation erfolgt der letzte Arbeitsschritt. Die Übertragung eines Aliquots des Überstandes und die Szintillatorsbeimischung. Für 24 Übertragungen benötigt die Maschine 8 Minuten.
Die Gesamtzeit für eine Analyse (ohne Inkubation und Zentrifugation außerhalb des Analysers) beträgt somit 24 Minuten pro Doppelbestimmung.

3.1.5 Reproduzierbarkeit

Der Automat führt pro Analysengang insgesamt 122 Verdünnungen, Dosierungen bzw. Pipettierungen durch. Um die Genauigkeit des Analyseautomaten zu bestimmen, wurden zehn Analysegänge simuliert, wobei das Zytosol und das Dextrankohlereagenz durch Puffer ersetzt wurden. Die Ergebnisse der anschließende Radioaktivitätsmessung sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1 Reproduzierbarkeit der Radioaktivitättsübertragungen

Versuch	Aktivitäten (CPM)					
	1	2	3	4	5	6
1	7919	14633	19209	25989	31726	37605
2	7782	14107	19200	25098	30987	36987
3	8307	14225	19584	24305	31848	40003
4	7995	13835	19410	23340	31631	38698
5	7808	13944	19685	24400	30687	37896
6	7850	14302	18371	24230	30611	39887
7	7894	15403	18698	25791	31793	39658
8	7649	14368	17835	25290	30456	38956
9	8022	14843	18633	25936	30176	38569
10	7889	14703	18985	25359	29875	39562
Mittelw.	7911	14436	18960	24994	30979	39362
Stand.ab.	0,7%	1,0%	1,0%	1,1%	0,7%	0,8%

Tabelle 1 zeigt das Ergebnis von zehn Pipettierreihen.

Da die Steroidrezeptoranalytik eines Tumors aufgrund des geringen Probenmaterials in der Regel nicht wiederholbar ist, das Ergebnis jedoch weitreichende therapeutische Konsequenzen hat, müssen höchste Maßstäbe an die Analysenqualität gelegt werden.

Zur Überprüfung der Stabiliät und Reproduzierbarkeit des Dextrankohleassays wurde ein thermostabiles Rezeptorreferenzpulver entwickelt. Hierdurch ist es möglich, täglich Präzisions- und Richtigkeitskontrollen bei der

Rezeptoranalytik durchzuführen.
Tabelle 2 zeigt das Ergebnis von an unterschiedlichen Tagen durchgeführte Analysen eines Kontrollpulvers. Es sind dabei die Scatchard-Analysen des Östrogen- und Gestagenrezeptors ausgewertet. Der Mittelwert der errechneten maximalen Bindungskapazität beträgt beim Östrogenrezeptor 154,4 fmol/mg Zytosolprotein. Die Standardabweichung liegt bei 6,5. Der Gestagenrezeptormittelwert liegt bei 841,4 fmol/mg Protein. Die Standardabweichung beträgt 34,7.

Tab. 2 Automatisierte Östrogen- und Gestagenrezeptoranalysen in Qualitätskontrollpulvern

Analysen-nummer	Östrogenrezeptorkonzentration (fmol/mg Cytosolprotein)	Gestagenrezeptorkonzentration (fmol/mg Cytosolprotein)
1	155	801
2	161	900
3	157	893
4	160	800
5	149	807
6	138	842
7	154	850
8	150	860
9	159	821
10	160	870
11	152	843
12	158	810

3.2 Entwicklung thermostabiler Rezeptorpräparationen

Zur Überprüfung der Thermostabilität wurden bei 4°C gelagerte Rezeptorpulver 16 Stunden verschiedenen Temperaturen ausgesetzt und anschließend der Rezeptorgehalt mittels Scatchard-Analysen und Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation bestimmt. Die Östrogen-, Gestagen-, Androgen- und Glucocorticoidrezeptoren wurden nach Lagerung bei 37°C, 60°C und 80°C charakterisiert. Die Ergebnisse der Scatchard-Analysen zeigt Tabelle 3.

Tab. 3 Temperaturabhängigkeit der Rezeptorkonzentration in Referenzpulvern.

	Bindungskapazität (%)			
Temperatur	ÖR	PR	AR	GR
4°	100	100	100	100
37°	103	104	88	101
60°	91	91	79	38
80°	79	20	2	-

Die Proben wurden 16 Stunden den angegebenen Temperaturen ausgesetzt.

Nach 16 Stunden bei 37°C zeigt nur der Androgenrezeptor einen Verlust der Bindungskapazität um 12%. Auch bei 60°C sind die Rezeptoren noch sehr stabil. 9% Verlust an Kapazität zeigen die Östrogen- und Gestagenrezeptoren. Der Androgenrezeptor verliert 21% und der Glucocorticoidrezeptor 62% seiner Bindungsaktivität. Bei 80°C zeigt sich der Östrogenrezeptor als der Stabilste der untersuchten Rezeptoren. Während die Progesteron-, Androgen und Glucocorticoidbindungsaktivität praktisch verschwunden ist, zeigt der Östrogenrezeptor noch 79% seiner Bindungsaktivität.

Das Sedimentationsverhalten der lyophylisierten Zytosolpräparation zeigt Abb. 11.
Durch das Lyophylisieren hat sich das Sedimentationsverhalten des Östrogenrezeptors (Abb. 11A) und des Glucocorticoidrezeptors (Abb. 11D) nicht verändert. Beide sedimentieren bei niedrigen Ionenkonzentrationen ausschließlich im 8S-Bereich.

Der Progesteronrezeptor (Abb. 11B) zeigt eine deutliche Änderung im Sedimentationsverhalten. Neben dem 8S-Peak zeigt sich eine deutliche Schulter, die bis etwa zum 6S-Bereich reicht.

Eine fast völlig verändertes Sedimentationsverhalten zeigt der Androgenrezeptor (Abb. 11C). Der 8S-Peak ist nur noch andeutungsweise zu erkennen. Die Bindungsaktivität ist hier breit verteilt. Vom Maximum im 8S-Bereich fällt die Bindungskurve ohne weitere Ausbildung eines Peaks kontinuierlich ab.

Die Sedimentationsprofile zeigten keine Änderung bis 60°C. Bei dem 80°C-Proben hingegen ist bei keinem Rezeptor mehr ein eindeutiges Profil zu erkennen. Die noch gering (Ausnahme ÖR: Restaktivität 79%!) vorhandene Bindung streut über den gesamten Sedimentationsbereich.

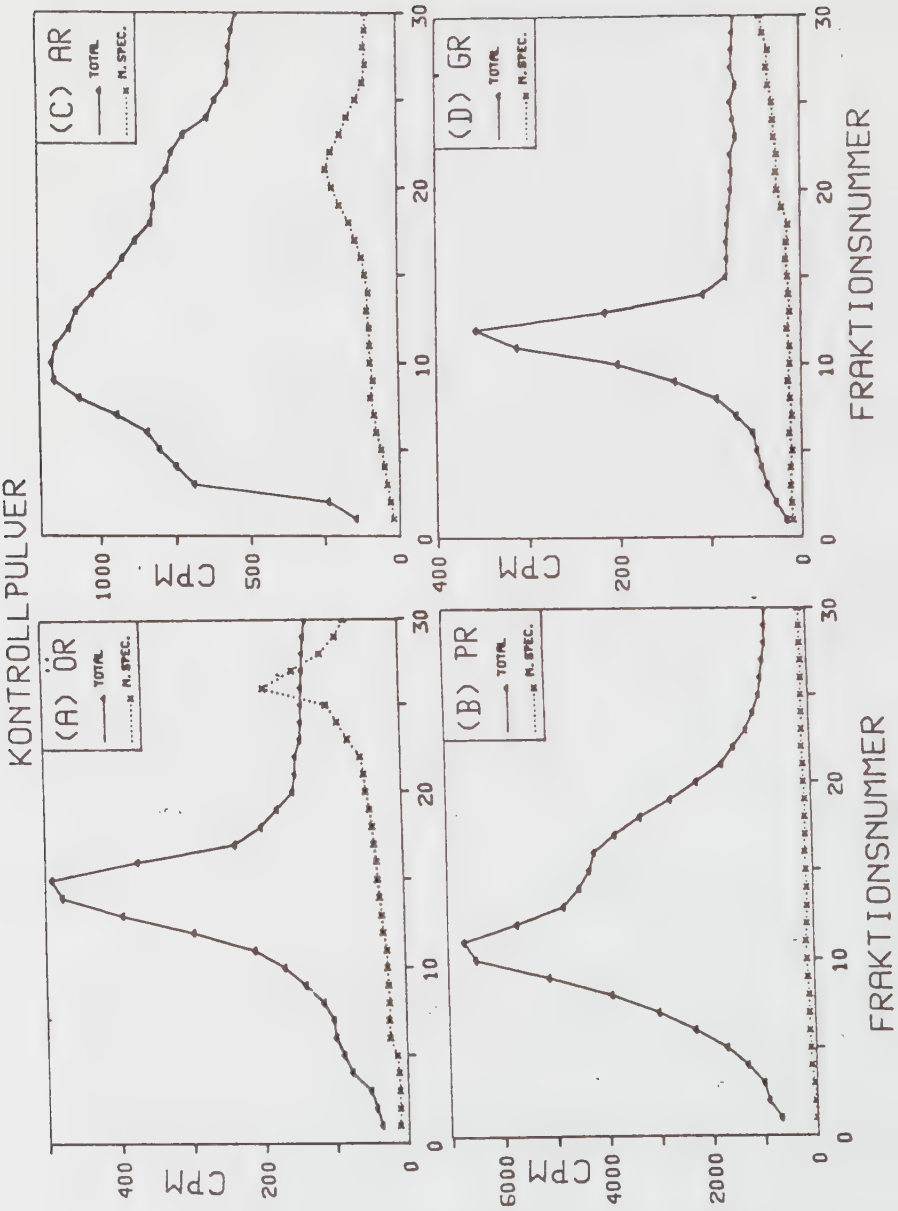


Abb. 11a,b,c und d zeigt das Sedimentationsverhalten der lyophilisierten Rezeptorpräparation.

3.3 Histochemische Untersuchungen

A. Untersuchungen mit Steroidalbuminderivaten.

Gefrierschnitte verschiedener Gewebe wurden nach der Methode von Lee inkubiert. Untersucht wurden Mammakarzinome mit unterschiedlichen Östrogenrezeptorgehalten. Bei allen Proben konnte unabhängig vom Rezeptorstatus eine deutliche Fluoreszenz nachgewiesen werden. Jedoch war diese nicht reproduzierbar und stand in keinem Zusammenhang zu den biochemisch ermittelten Rezeptordaten. Es zeigte sich auch keine Übereinstimmung der Fluoreszensintensitäten bei Verwendung des Rhodamin- bzw. Fluoreszein-markierten Steroidalbuminderivats. Darüberhinaus schlugen sämtliche Kompetitionsversuche fehl.
Durch drastische Senkung der Konzentration des Fluoreszenspräparates wurde versucht, die unspezifische Bindung herabzusetzen. Zur Beobachtung der nun deutlich reduzierten Fluoreszenssignale wurde dabei eine Dreistufen-Restlichtverstärkerkamera (Euroatlas, Typ Venus III) eingesetzt. Jedoch waren auch die geringen Fluoreszenssignale nicht durch gleichzeitige Inkubation mit freien Hormonen zu reduzieren.

B. Untersuchungen mit Coumestrol.

Die Anregungswellenlänge des Coumestrols liegt im UV-Bereich bei 340 nm, die Emissionen im blauen Bereich des sichtbaren Lichts. Es zeigte sich bei der mikroskopischen Beobachtung von nicht gefärbten Schnitten, daß die Eigenfluoreszens des Gewebes bei UV-Anregung sehr hoch war. Ein weiteres Problem lag darin, daß die Glasoptik bei 340 nm Wellenlänge schon große Absorptionen aufweist. Deshalb war es nicht möglich zwischen Eigenfluoreszens, unspezifischen Einlagerungen und

spezifischer Bindung zu unterscheiden.
Nachdem es nicht möglich war ortsaufgelöste Fluoreszenzuntersuchungen mit Coumestrol durchzuführen, wurden quantitative Meßreihen mit einem Fluoreszensphotometer durchgeführt. Dabei wurde bei dem in 2.3.1. beschriebene Dextrankohleassay, das tritiierte Hormon durch das Coumestrol ersetzt.

Durch Verdrängungskurven wurde eine etwa 10-fach geringere Affinität zum Rezeptor im Vergleich zum 17ß-Östradiol gefunden. Deshalb wurden Konzentrationen von 10–100 nMol/l eingesetzt.
Es zeigte sich, daß nur bei Zytosolen mit einem hohen Rezeptorgehalt (500 fmol/mg Protein) geringe, aber reproduzierbare Extinktionsdifferenzen zu ermitteln waren. Die Meßanordnung war jedoch nicht empfindlich genug, um eine Auswertung nach Scatchard durchzuführen.

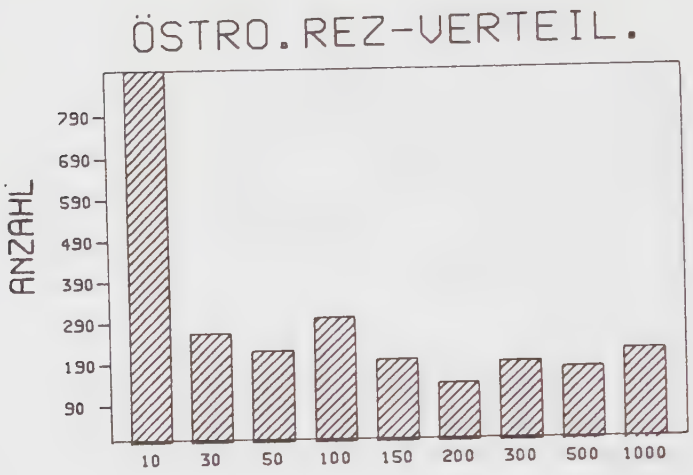
3.4 Mammakarzinom

In der Zeit von Januar 1980 bis März 1983 wurden 3480 Biopsien aus Mammakarzinomgewebe auf Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht. Es handelte sich dabei um 2912 Primärtumore und 568 Metastasen. Die überwiegende Anzahl der Metastasen stammten aus regionären Lymphknoten bzw. aus Lokalrezidiven.

3.4.1 Östrogen- und Gestagenrezeptorverteilung

Abbildung 12 zeigt den Rezeptorgehalt, eingeteilt in verschiedene Klassen. Es ist zu erkennen, daß sowohl bei der Östrogenrezeptorverteilung (Abb. 12a) als auch bei der Gestagenrezeptorverteilung (Abb. 12b) die größte Anzahl der untersuchten Proben in der Gruppe bis 10 fmol/mg Zytosolprotein lag. Alle anderen Gruppen enthielten eine ähnliche Anzahl von Tumoren.

REZEPTORVERTEILUNG IN KLASSEN (FMOL/MG



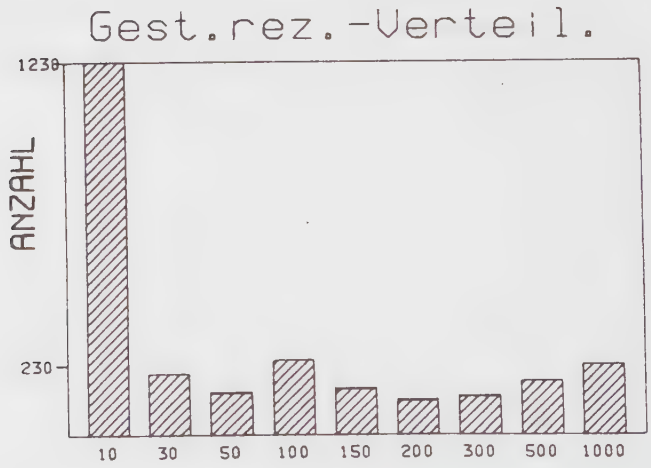


Abb. 12 a+b zeigen die absolute Anzahl der Tumorbiopsien in Klassen mit verschiedenen Bindungskapazitäten.

Bezeichnet man Tumore mit einem Rezeptorgehalt kleiner als 10 fmol/mg Protein als rezeptornegativ und größer gleich als 10 fmol/mg als rezeptorpositiv, kommt man bei der Betrachtung beider Rezeptoren zu einer Verteilung, wie sie in Abbildung 13 dargestellt ist. 50% der Primärtumoren (Abbildung 13a) waren östrogen- und gestagenrezeptorpositiv. 27% waren nach oben genannten Kriterien östrogen- und gestagenrezeptornegativ. Der Prozentsatz der nur östrogenrezeptorpositiven Tumoren lag bei 17%, der nur gestagenrezeptorpositiven bei 6%.
Bei den untersuchten Metastasen zeigte sich eine andere Verteilung (Abbildung 13b). Hierbei waren nur 38% der untersuchten Biopsien sowohl östrogenrezeptorpositiv als auch gestagenrezeptorpositiv. Dagegen konnten bei 44% der Fälle Östrogen- und Gestagenrezeptorgehalte von kleiner 10 fmol/mg gefunden werden. Der Prozentsatz der einfach rezeptorpositiven Tumoren lag in der gleichen Größenordnung wie bei den Primärtumoren.

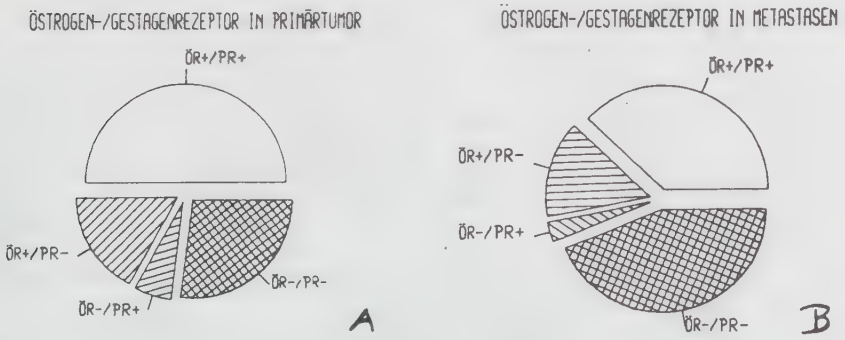


Abb. 13 a+b zeigt die prozentuale Verteilung des Rezeptorstatus in Primärtumoren und Metastasen.

3.4.2 Altersverteilung

Abbildung 14 zeigt die Verteilung der Inzidenz in Abhängigkeit vom Alter der Patientinnen. Bis etwa zum Alter von 30 Jahren ist das Auftreten eines Mammkarzinoms sehr selten. Danach nimmt die Häufigkeit stark bis zu einem Alter von etwa Ende 40 Jahren zu. Von hier an bleibt die prozentuale Häufigkeit innerhalb der einzelnen Jahrgänge recht konstant. Recht deutlich zeigt die Inzidenzkurve nun eine Parallelverlauf zu der Alterspyramide.

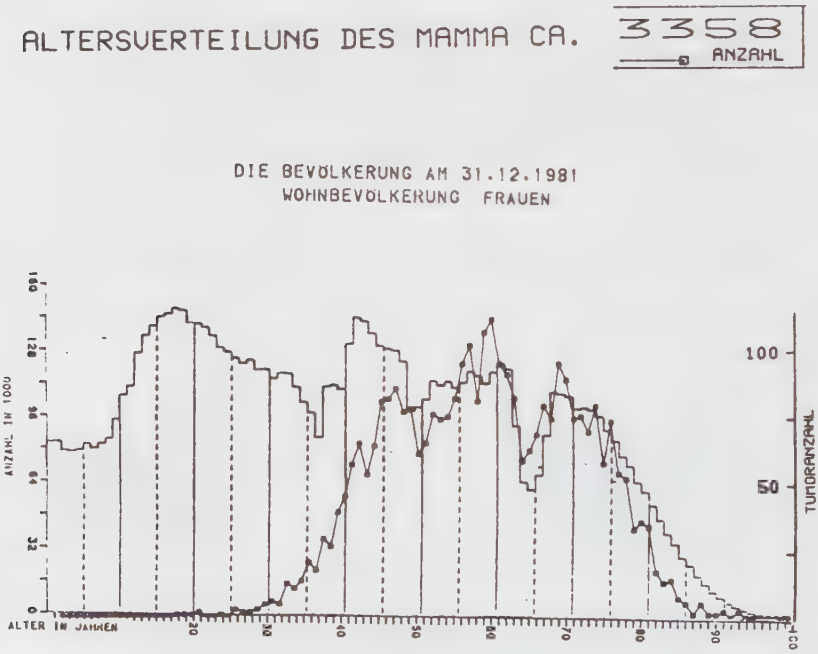


Abb. 14 zeigt die absolute Anzahl der Tumore pro Geburtsjahrgang im Vergleich zur Alterspyramide.

REZEPTORVERTEILUNG IN ALTERSKLASSEN

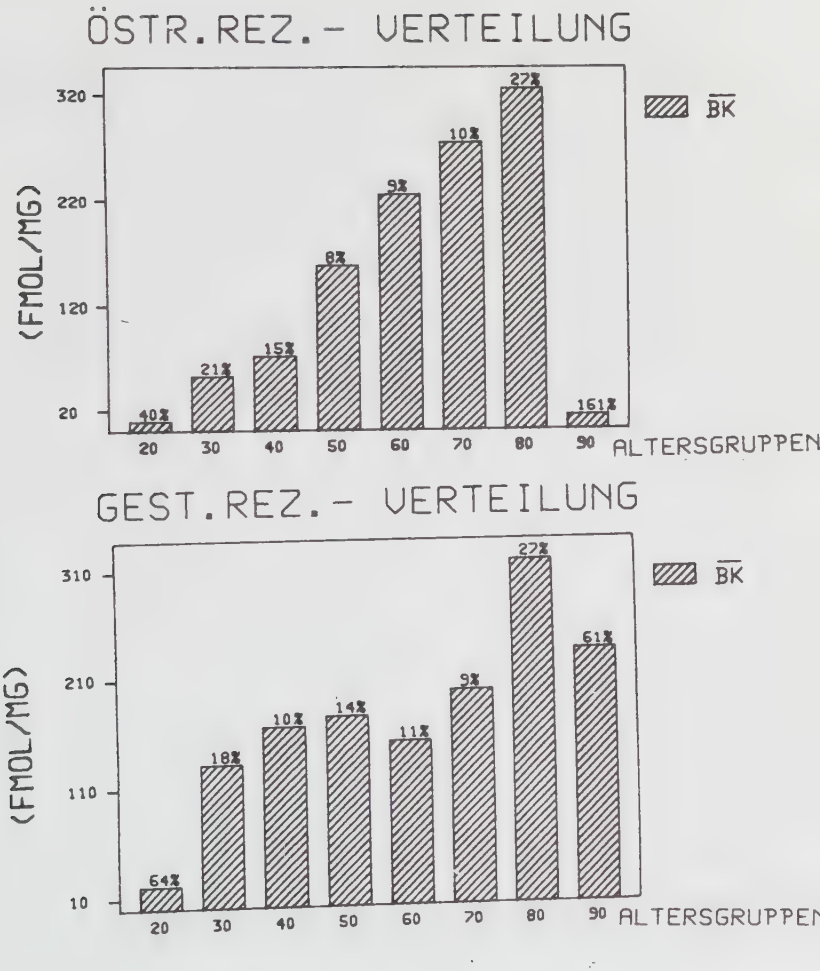


Abb. 15a und b zeigt den durchschnittlichen Rezeptorgehalt in den verschiedenen Altersklassen. Die Zahlen auf den Balken geben die Standardabweichung vom Mittelwert in Prozent an.

Den durchschnittlichen Hormonrezeptorgehalt innerhalb der einzelnen Altersklassen zeigt Abbildung 15. Bei der Betrachtung des Östrogenrezeptors sieht man ein kontinuierliches Ansteigen der Rezeptorkonzentration von der Altersklasse ab 20 bis 80, danach zeigt sich ein Abfall der Östrogenrezeptorkonzentration. Einschränkend hierzu muß gesagt werden, daß die Anzahl der Tumore in der ersten (bis einschließlich 20 Jahre) und letzten (älter als 90 Jahre) Gruppe zu klein ist, um hieraus Schlüsse zu ziehen.
Bei den Gestagenrezeptoren ist kein eindeutiger Anstieg wie bei den Östrogenrezeptoren zu beobachten. Mit Ausnahme der ersten Gruppe, deren Anzahl klein ist, sind die durchschnittlichen Gestagenrezeptorgehalte in den einzelnen Altersklassen nicht signifikant unterschiedlich.

Abbildung 16 zeigt die Altersabhängigkeit der vier Rezeptorkonstellationen. Betrachtet man den Verlauf der Kurve östrogen- und gestagenrezeptornegativer Tumoren, sieht man einen Abfall mit zunehmendem Alter. Gegenläufig verhält sich die Kurve mit östrogen- und gestagenrezeptorpositiven Tumoren. Von 34% in der Altersgruppe bis 35 steigt der Anteil auf 50% in der Gruppe der über 80-jährigen Patientinnen. Die Kurve der nur östrogenrezeptorpositiven Tumore steigt ebenfalls mit dem Alter an. Der ohnehin schon geringe Prozentsatz der nur gestagenrezeptorpositiven Tumore sinkt mit steigendem Alter weiterhin ab.

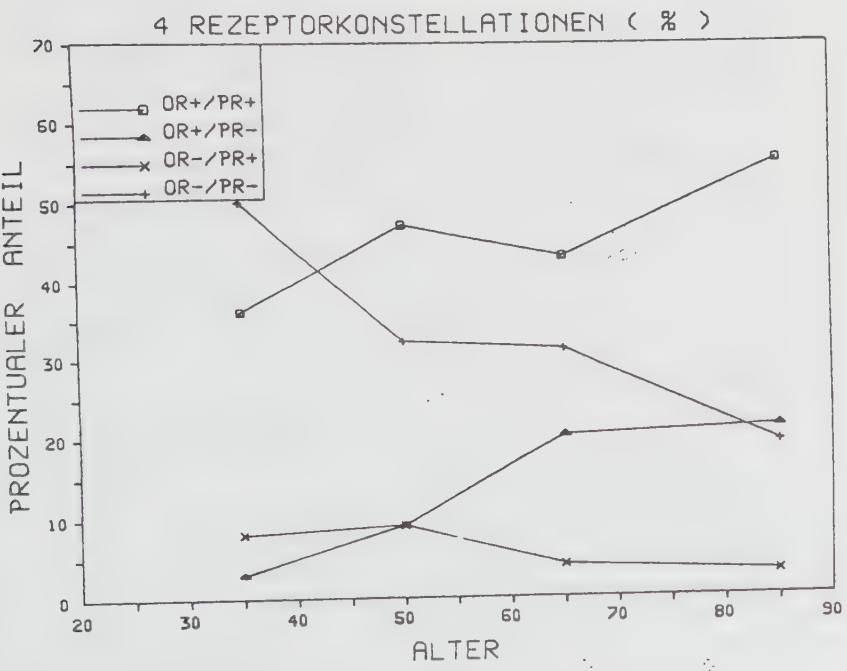


Abb. 16 zeigt die Altersabhängigkeiten der verschiedenen Rezeptorkonstellationen.

3.4.3 Methodenvergleich

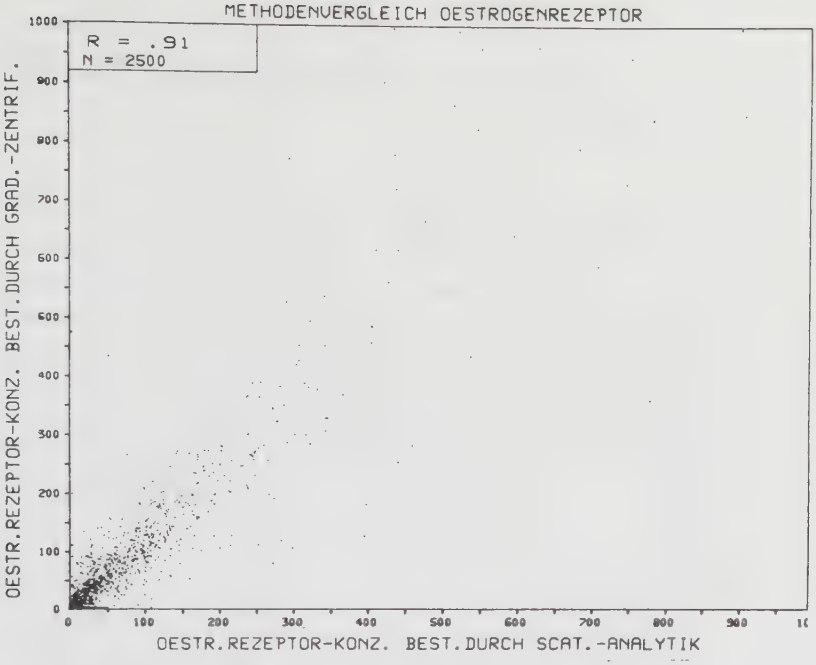
500 mg Tumormasse waren notwendig, um die Östrogen- und Gestagenrezeptorbestimmung mit Hilfe der Scatchardanalytik und zusätzlich mit der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchzuführen. Abbildung 17 zeigt die Korrelation der Bindungskapazitäten, ermittelt mit den o.g. Methoden. Sowohl für die Östrogen- als auch für die Gestagenrezeptorbestimmung ergab sich eine gute Korrelation. Da sich aus der Scatchardanalytik eine theoretische, maximale Bindungskapazität, aus der Dichtegradientenzentrifugation hingegen eine praktische Sättigungskapazität errechnete, liegt der Durchschnittswert bei Zentrifugationsanalyse etwas niedriger.

Neben der Bindungskapazität ergeben sich aus beiden Methoden zusätzliche Information über den Rezeptor.

Bei der Scatchardanalyse ist es die scheinbare Dissotiationskonstante. Sie liegt beim Östrogenrezeptorkomplex bei 5×10^{-10} mol/l, beim Gestagenrezeptorkomplex bei 2×10^{-9} mol/l.

Ein wichtiger Grund für die Dichtegradientenzentrifugaton ist die Unterscheidung in ein 8S- und 4S-Rezeptorprotein. Der prozentuale Anteil des 8S-Anteils steigt beim Östrogenrezeptor mit steigender Rezeptorkonzentration. Der Korrelationskoeffizient liegt bei 0,48. Abbildung 18a zeigt aber auch deutlich, daß Tumore mit niedrigem 8S-Anteil und hohen Bindungskapazitäten vorkommen. Auch gibt es Fälle mit hohem 8S-Anteil und niedrigen Bindungskapazitäten.

Bei der Gestagenrezeptorcharakterisierung konnte keine signifikante Korrelation zwischen dem 8S-Anteil und der Bindungskapazität ermittelt werden (Abb. 18b).



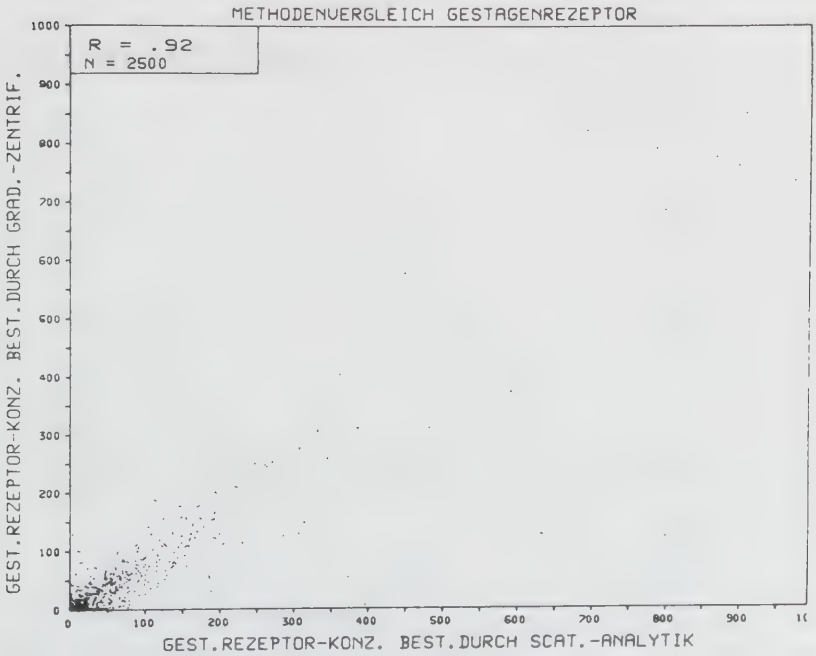
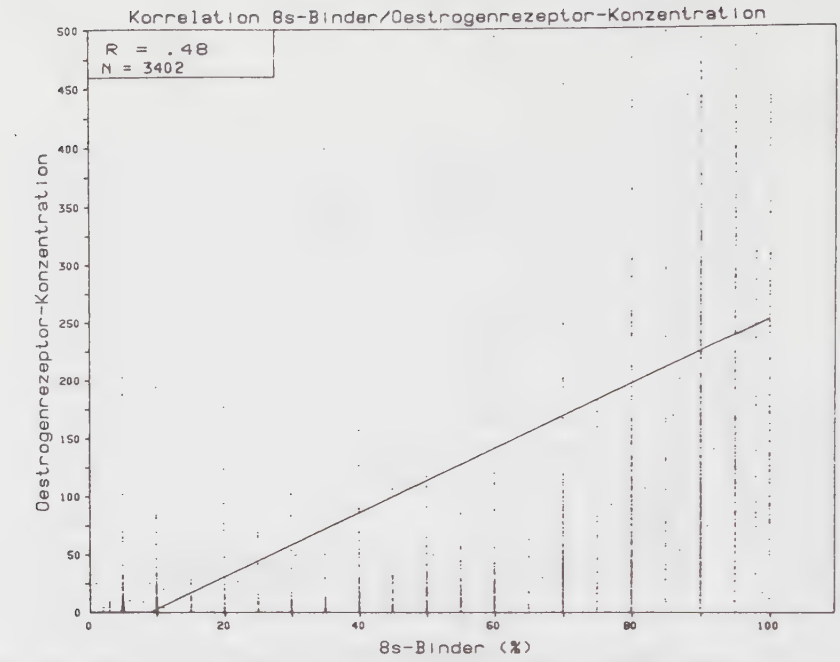


Abb.17 zeigt die Korrelation Scatchard-Analytik
/Gradientenzentrifugation



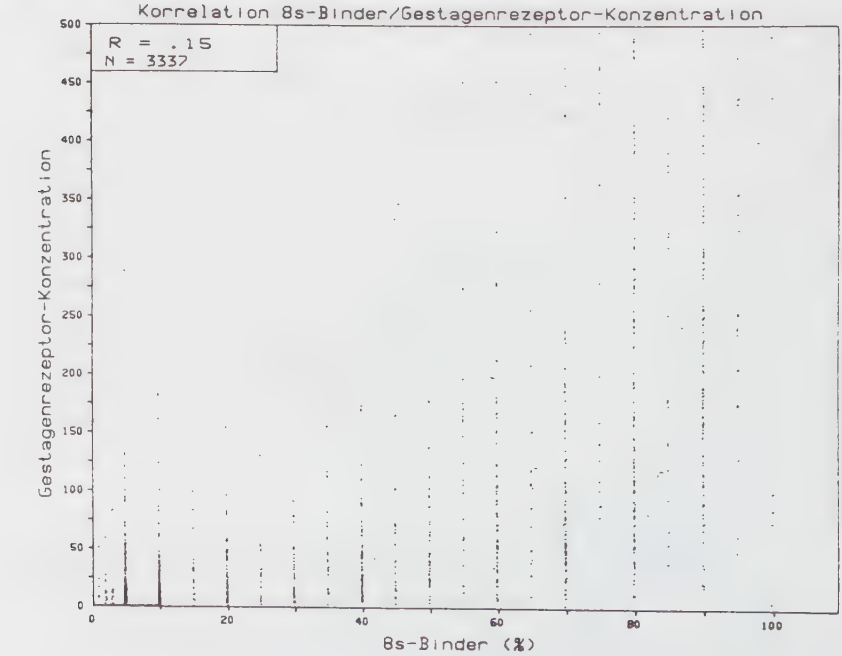


Abb. 18 a+b zeigt die Korrelation des 8S-Binders zur Konzentration

3.4.4 Korrelation Östrogenrezeptor/Gestagenrezeptor

Die qualitative Abhängigkeit des Gestagenrezeptors vom Östrogenrezeptor ist eindeutig geklärt (s. 3.4.1). Ein gestagenrezeptorpositiver Tumor bei nicht nachweisbarem Östrogenrezeptor scheint eine Ausnahme zu sein. Ob auch eine quantitative Abhängigkeit besteht, wurde anhand von 2033 Tumorbiopsien untersucht. Abbildung 19 zeigt, daß der Korrelationskoeffizient bei 0,22 liegt. Es zeigt sich also, daß eine quantitative Abhängigkeit im strengen Sinne nicht besteht.

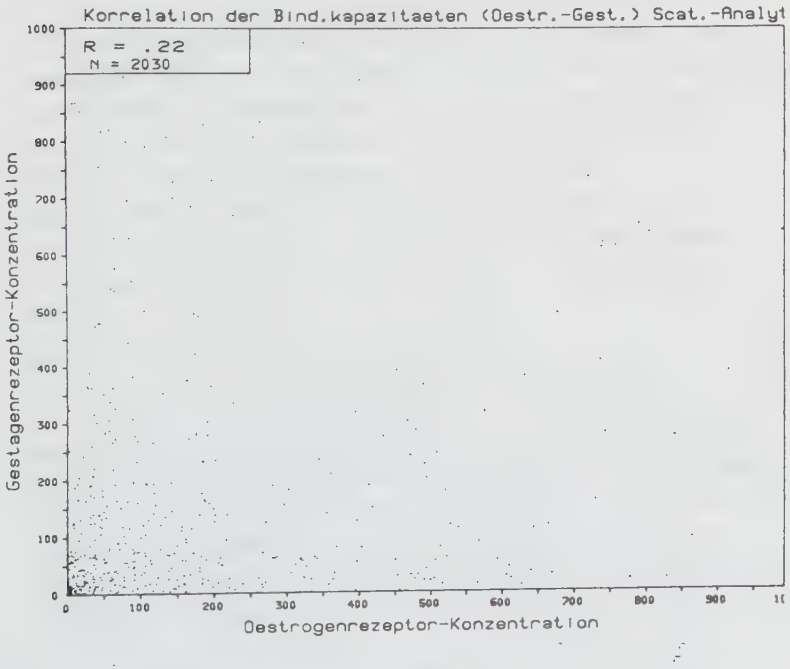


Abb. 19 zeigt den Zusammenhang Östrogrenrezeptorgehalt/Gestagenrezeptorgehalt.

3.4.5 Gestagenrezeptorpositive/Östrogenrezeptornegative Tumore

Falls der Gestagenrezeptor beim Mammakarzinom ebenso wie in verschiedenen Modellen unter östrogener Kontrolle steht, dürfte der Fall eines positiven Gestagenrezeptors bei negativem Östrogenrezeptor nicht auftauchen. Da die Zuordnung zum rezeptorpositiven bzw. rezeptornegativem Tumor durch einen 'cutoff point' willkürlich festgelegt ist, wird es trotzdem einige der o.g. Konstellationen geben. In meinen Untersuchungen waren 138 Fälle = 5%, bei einem 'cutoff point' von 10 fmol/mg Zytosolprotein, der Gruppe ÖR-/PR+ zuzuordnen. Bei gleichzeitiger Betrachtung der Gradientenzentrifugationsergebnisse zeigt sich, daß bei 40 Fällen zwar eine Östrogenrezeptorkonzentration unter 10 fmol/mg gefunden wurde, aber das Rezeptorprotein zu über 30% im 8S-Bereich sedimentierte. In weiteren 63 Fällen zeigte sich bei der Betrachtung des Gestagenrezeptors zwar eine Bindungskapazität, die größer als 10 fmol/mg war, jedoch sedimentierten die Rezeptorproteine überwiegend im 4S-Bereich (über 70%).

3.4.6 Betrachtung des 'Rezeptorwechsels'

Um die Frage abzuklären, ob und in wievielen Fällen eine andere Rezeptorkonstellation bei Metastasen als bei Primärtumoren vorliegt, wurden sequentielle und parallele Rezeptorbestimmungen bei Primärtumoren und Metastasen durchgeführt. In 39 Fällen konnten sequentielle Untersuchungen an Primärtumoren und Metastasen mit einem maximalen Intervall von 28 Monaten untersucht werden. Dazu kamen 8 Fälle von Doppelbestimmungen an Metastasen, die zeitlich versetzt erschienen bzw. operiert worden waren.

Bei 34 Primärtumoren wurden bei gleichzeitig entfernten Metastasen die Rezeptoranalytik durchgeführt. In 8 Fällen konnten parallel operierte Metastasen verschiedener Lokalisation untersucht werden.
Bei der Betrachtung des Östrogenrezeptorstatus zeigte sich in 10.5% der ÖR+ Tumorbiopsien ein Rezeptorverlust. Bei 16.1% der untersuchten östrogenrezeptornegativen Primärtumore sind östrogenrezeptorpositive Metastasen nachgewiesen werden.
Bei den Gestagenrezeptoruntersuchungen zeigte sich, daß der Rezeptorverlust deutlich höher war. 31.2% der Metastasen von gestagenrezeptorpositiven Tumoren zeigten keinen Progesteronrezeptor. Der Wechsel von gestagenrezeptornegativen Befunden zu -positiven konnte in 5,4% der Fälle nachgewiesen werden. Bei der Betrachtung des Östrogen- und Gestagenrezeptorstatus ergaben sich folgende Konstellationen: 65,9% der ÖR+/PR+ Fälle zeigten weder beim Östrogen- noch beim Gestagenrezeptor einen Wechsel zum rezeptornegativen.
80% der ÖR-/PR-Primärtumoren zeigten den gleichen Befund in ihren Metastasen. Nur bei einem einzigen Fall war ein Wechsel vom östrogen- und gestagenrezeptornegativen Primärtumor zur ÖR+/PR+ Metastase nachweisbar.

3.4.7 Jahreszeitliche Schwankungen

Da sich an manchen Tagen die Tumoren mit geringen Rezeptorkonzentration zu häufen scheinen und in anderen Wochen überwiegend Ergebnisse mit hohen Rezeptorkonzentationen vorzuliegen schienen, wurde eine jahreszeitliche Abhängigkeit der Rezeptorkonzentration vermutet. Bei der Auswertung der Proben die 1980 untersucht worden waren, zeigte sich auch ein eindeutiges Maximum der Östrogenrezeptorkonzentration im August. Das Maximum bei den Gestagenrezeptoruntersuchungen lag dagegen einen Monat später.
Beim Betrachten des gesamten Beobachtungszeitraumes (1980-1983) hingegen relativieren sich diese Betrachtungen. Abbildung 20 zeigt zwar immer noch monatliche Schwankungen der Rezeptorkonzentration; hohe Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Gruppen deuten jedoch auf statistisch nicht signifikante Schwankungen hin.

1980 - 82 n = 3245

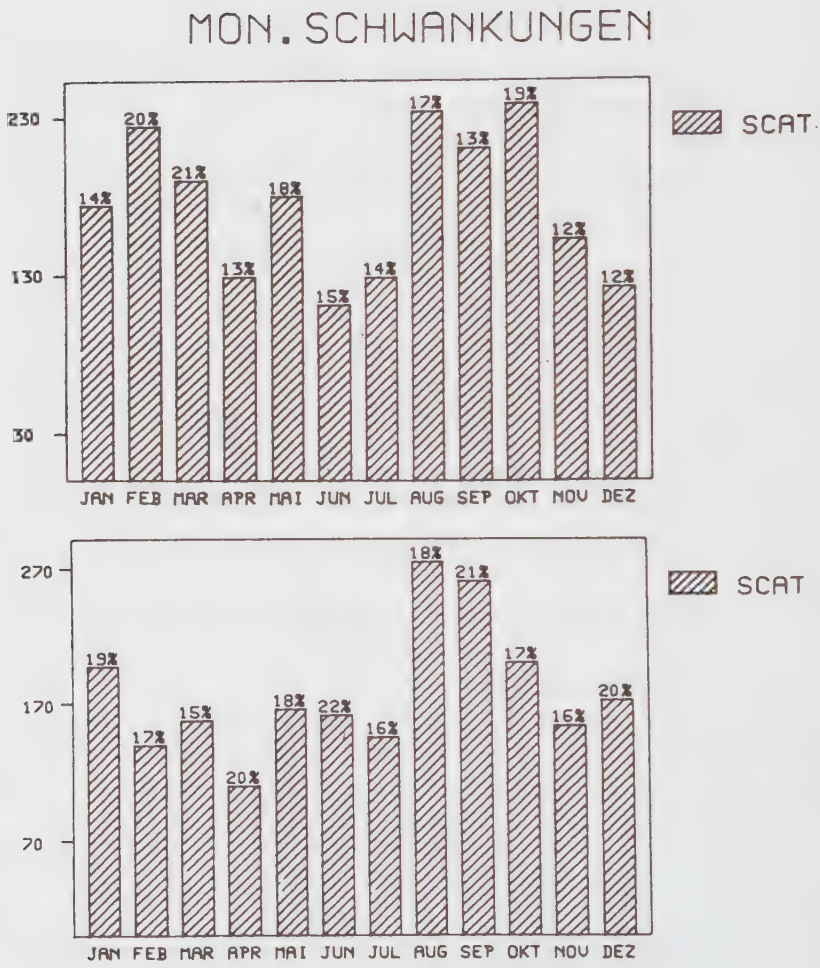


Abb. 20 zeigt die Schwankungen der Bindungskapazität innerhalb der verschiedenen Monate. Die Zahl über den Balken gibt die Standardabweichung vom Mittelwert in Prozent an.

3.5 Ovarialkarzinome

65 Biopsien von epithelialen Ovarialkarzinomen wurden auf Östrogen- und Gestagenrezeptoren untersucht. Die östrogenbindende Komponente wurde dabei näher untersucht, um einige zusätzliche Daten zur Rezeptornatur des Östrogenbinders zu sammeln.

3.5.1 Untersuchungen des Östrogenbinders

Die Interaktion von 17ß-Östradiol mit seinem zytoplasmatischen Binder in epithelialen Ovarialkarzinomen wurde sowohl durch Untersuchungen im Äquilibrium als auch durch kinetische Analysen der Bindungsreaktion dargestellt. Die Scatchardanalyse der zytoplasmatischen Östrogenbindung (Abbildung 21) zeigt einen monophasischen Kurvenverlauf. Dies wird als Hinweis auf die Existenz einer homogenen Klasse von Bindungsstellen interpretiert. Die scheinbare Dissoziationskonstante lag im Bereich von 10^{-10} bis 10^{-9} mol/l.

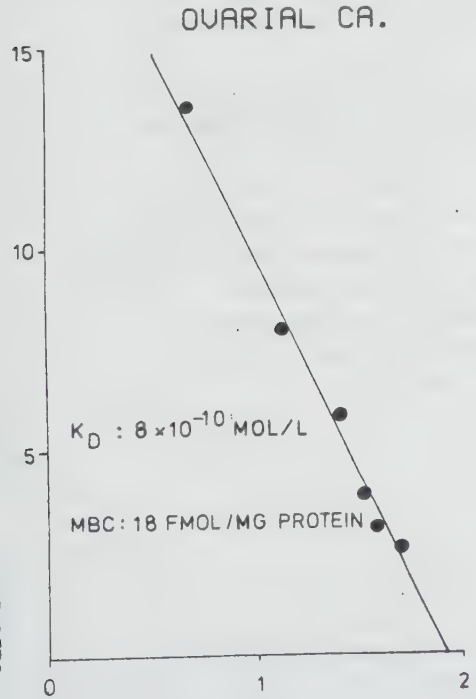


Abb. 21 zeigt eine repräsentative Scatchard-Auswertung des Östrogenbinders im Ovarialkarzinom.

Neben den im Äquilibrium durchgeführten Analysen wurden kinetische Untersuchungen der 17ß-Östradiolbindungsreaktion durchgeführt. Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstante k_1 für die Östrogenbindungsreaktion bei 0°C betrug 5×10^4 1 mol^{-1} sec^{-1}. Die Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} bei 0°C lag bei 8×10^{-7} sec^{-1}. Die aus den kinetischen Messungen errechnete Dissoziationskonstante betrug $1{,}6 \times 10^{-11}$ mol/l. Im Vergleich hierzu zeigt sie aus Äquilibriumsmessungen einen Wert von $5{,}2 \times 10^{-10}$ mol/l.
Die relativen Affinitäten von einigen Steroidhormonen für den zytoplasmatischen Östrogenbinder in epithelialen Ovarialkarzinomen, ermittelt durch Kompetitionsanalysen, zeigt Abbildung 22. Die Ligandenspezifität der Bindungskomponenten zeigt eindeutig auf Östrogene. Die Bindung von radioaktivmarkiertem 17ß-Östradiol wurde von unmarkiertem 17ß-Östradiol, Östron, Östriol und dem synthetischen Östrogen Diäthylstilböstrol, welches keine Steroidstruktur besitzt, inhibiert. Alle anderen getesteten Steroide zeigten keine Kompetition.
Repräsentative Sedimentationsprofile des Östrogenbinders, ermittelt durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, bei niedriger Salzkonzentration, zeigt Abbildung 23. Die spezifische Bindung von (^{3}H) 17ß-Östradiol ergibt sich aus der Differenz der Kurvenfläche in Abwesenheit (durchgezogene Linie) und Anwesenheit eines Überschusses an nichtradioaktivem Diäthylstilböstrol. Man erkennt, daß bei niedrigen Ionenkonzentrationen die 17ß-Östradiolbindungskomponente entweder ausschließlich im 8S-Bereich (Abb. 23A) oder in der 4S und 8S-Region (Abb. 23B) sedimentiert.

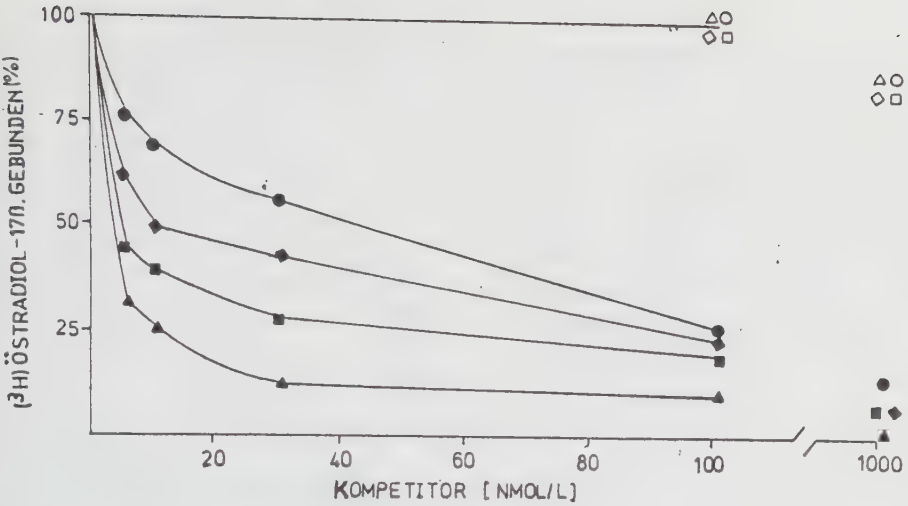


Abbildung 22 Inhibition der zytoplasmatischen (^{3}H)-Östradiolbindung durch steigende Konzentrationen nichtradioaktiver Kompetitoren.
(▲ - ▲) 17ß-Östradiol, (■ - ■) Östron, (◆ - ◆) Diäthylstilböstrol, (● - ●) Östriol, (Δ - Δ) Progesteron, (□ - □) 5-alpha-DHT, (○ - ○) Aldosteron, (◇ - ◇) Corticosteron.

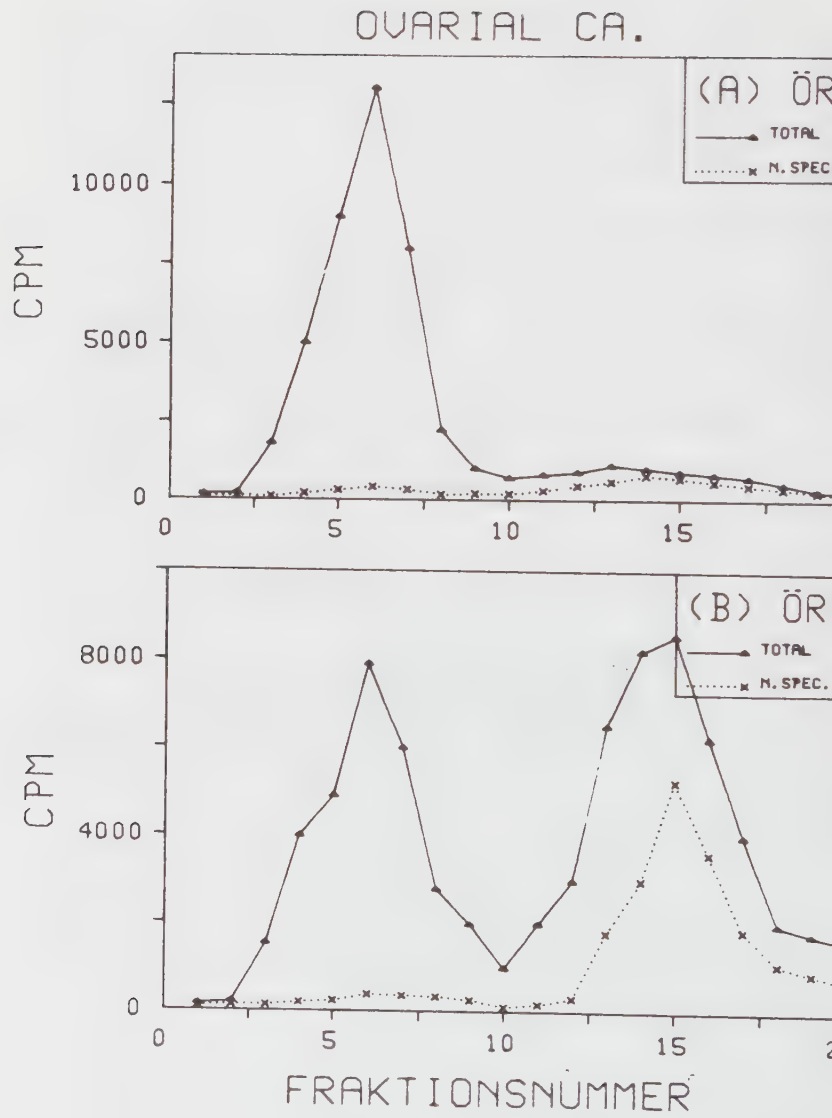


Abb. 23a + b zeigt typische Sedimentationsprofile des Östrogenrezeptors in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

3.5.2 Untersuchungen des Gestagenbinders

Der Progesteronrezeptor wurde teilweise durch Analysen im Äquilibrium und durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation charakterisiert.

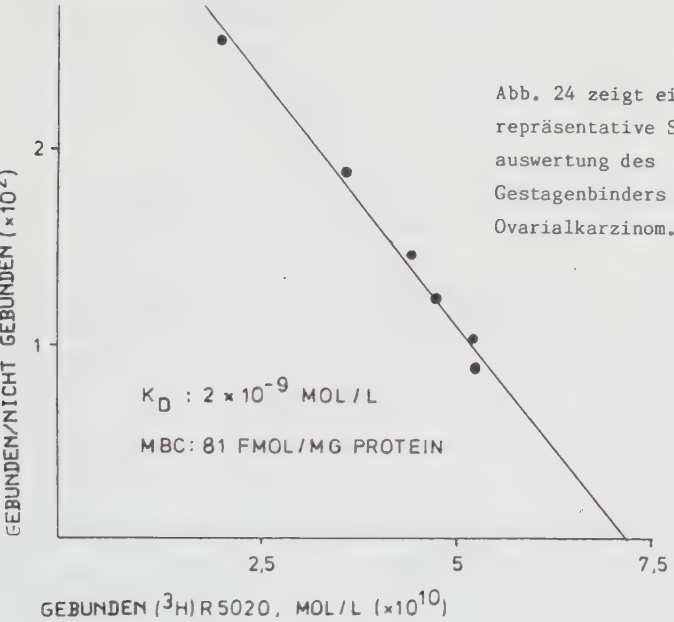


Abb. 24 zeigt eine repräsentative Scatchard-auswertung des Gestagenbinders im Ovarialkarzinom.

Wie aus dem Scatchard-Plot in Abbildung 24 zu entnehmen ist, wurde das synthetische Gestagen Promegeston (R 5020) hochaffin (K_D 2x10^{-9} mol/1) an eine einheitliche Klasse zytoplasmatischer Rezeptoren gebunden.
Abbildung 25 zeigt, daß der Promegestonbinder im 4S und 8S Bereich sedimentiert. Dabei ist die Bindung im 4S Bereich nur zum Teil spezifisch, da unmarkiertes Promegeston nicht vollständig die Bindung des radioaktiven Promegestons unterdrückt.

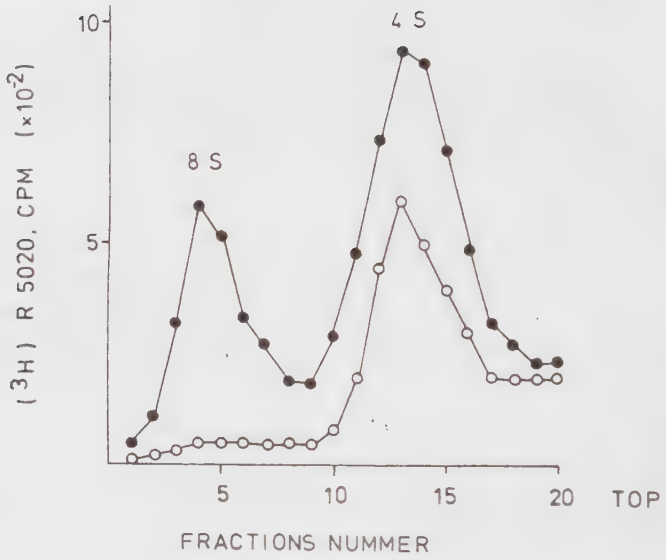


Abb. 25 zeigt ein repräsentatives Sedimentationsprofil des R 5020-Binders im Ovarialkarzinom.

3.5.3 Östrogen- / Gestagenrezeptormuster

Tabelle 4 zeigt die Verteilung von Östrogen- und Gestagenrezeptoren in Primärtumoren und Metastasen von epithelialen Ovarialkarzinomen. Als 'cutoff' Punkt wurde beim Östrogenrezeptor 3 fmol/mg und beim Gestagenrezeptor 10 fmol/mg Zytosolprotein gewählt. Zytosole aus 65 Primärtumoren und Metastasen wurden untersucht. 57% der Tumore waren östrogenrezeptorpositiv. Etwa 37% der Biopsien enthielten sowohl Östrogen- wie Gestagenrezeptoren. 32% stellten sich als östrogenrezeptornegativ heraus. In 7,6% konnte eine positive

Promegestonbindungsaktivität in Abwesendheit bzw. bei sehr geringen Konzentration (<3 fmol/mg) von Östrogenrezeptoren aufgezeigt werden.

Tabelle 4: Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Primärtumoren und Metastasen von epthelialen Ovarialkarzinomen

Rezeptorstatus	Primärtumoren & Metastasen		Primärtumoren		Metastasen	
	AZ	(%)	AZ	(%)	AZ	(%)
ÖR+ PR+	24	(36.9)	22	(45.8)	2	(11.8)
ÖR+ PR-	20	(30.1)	11	(22.9)	9	(52.9)
ÖR- PR+	5	(7.6)	4	(8.4)	1	(5.8)
ÖR- PR-	16	(24.4)	11	(22.9)	5	(29.5)
Total	65		48		17	

ÖR+ ≥ 3 fmol/mg Zytosolprotein; PR+ ≥ 10 fmol/mg Zytosolprotein

Betrachtet man die Ergebnisse der Rezeptoranalysen bei Primärtumoren und Metastasen, sieht man keinen signifikanten Unterschied bei den Östrogenrezeptorbefunden. Jedoch zeigt sich deutlich, daß der Prozentsatz der ÖR+/PR- Tumore bei Metastasen höher lag. Die Konzentrationen von Östrogen- und Gestagenrezeptoren im Vergleich zum Rezeptorstatus sind in Tabelle 5 dargestellt. Vergleicht man die

Östrogenrezeptorkonzentrationen in den ÖR+/PR- Gruppen, erkennt man, daß ein negativer Gestagenrezeptor nicht mit geringen Östrogenrezeptorkonzentrationen korreliert. Auch ist die Progesteronrezeptorkonzentration in der Gruppe der ÖR-/PR+ Tumore nicht niedriger als in der ÖR+/PR+ Gruppe.

Tabelle 5. Östrogen- und Progesteronrezeptorkonzentration im Vergleich zum Rezeptorstatus

	Bindungskapazität (fmol/mg Zytosolprotein)			
	ÖR		PR	
Rezeptorstatus	Durchschnitt	Streubreite	Durchschnitt	Streubreite
ÖR+ PR+	51	5-211	94	18-279
ÖR+ PR-	68	6-482	3	0-9
ÖR- PR+	ND	ND	180	21-530

ER+ > 3 fmol/mg Zytosolprotein, PR+ > 10 fmol/g Zytosolprotein,
ND: nicht meßbar

Obwohl kein quantitativer Unterschied der Östrogenrezeptoren in der ÖR+/PR+ Gruppe im Vergleich zur ÖR+/PR- Gruppe zu finden war, stellte sich die Frage, ob qualitative Unterschiede der Östrogenrezeptormoleküle für das Fehlen des Gestagenrezeptors verantwortlich sind. Tabelle 6 stellt das Sedimentationsverhalten der Östrogenrezeptoren in

Saccharosedichtegradienten bei niedriger Ionenkonzentrationen dar.

Es zeigt sich keine Verschiebung der Sedimentationsprofile des Östrogenrezeptors von 8S in den 4S Bereich bei den Tumoren, in denen der Gestagenrezeptor nicht nachweisbar ist, im Vergleich zu denen mit vorhandenem Gestagenrezeptor.

Tabelle 6. Sedimentationsverhalten von spezifischem Östrogen- und Progesteronbinder bzw. Rezeptorstatus

Rezeptorstatus	ER		PR	
	4S(%)	8S(%)	4S(%)	8S(%)
ÖR+ PR+	49	51	41	59
ÖR+ PR-	32	68	99	1

3.6 Hodentumore

Zytosole aus Biopsien von 9 humanen Hodenkarzinomen wurden mittels Scatchard Analytik und Saccharosedichtegradientenzentrifugation auf die Anwesenheit von Rezeptorproteinen für Östrogene, Gestagene, Androgene und Glucocorticoide hin untersucht.

3.6.1 Östrogenrezeptoren

Aus Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß nur in einer von 9 Biopsien signifikante Mengen von (^{3}H)17ß-Ostradiol gebunden worden sind. Die scheinbare Dissoziationskonstante lag bei 2,4 x 10^{-9} mol/l.
Das Sedimentationsprofil zeigte nur im 4S-Bereich eine spezifische Bindung (Abbildung 26a). Die Zytosolpräparationen von weiteren 7 Tumoren war entweder komplett östrogenrezeptornegativ oder zeigten nur eine sehr geringe Bindungskapazität. Das Zytosol einer dieser Biopsien (Fall Nr. 1) zeigte trotz niedriger Bindungskapazität deutliche 8S Bindung.

3.6.2 Gestagenrezeptoren

Tabelle 7 zeigt die Ergebisse der Promegestonbindungsstudien. Wie zu sehen ist, konnte in 5 von 9 Biopsien ein sehr geringer Wert an spezifischer Bindung ermittelt werden. Mit Ausnahme des Falles Nr. 1 (Abbildung 26b) sedimentiert in allen Biopsien die Bindungskomponente ausschließlich im 4S-Bereich. Die scheinbare Dissoziationskonstante, ermittelt durch Scatchard-Analytik, lag für die R 5020-Bindung bei 4,5 x 10^{-9} mol/l (Fall Nr. 1).

3.6.3 Androgenrezeptoren

Die Ergebnisse der Androgenbindungsstudien sind gleichfalls in Tabelle 7 zusammengestellt. Nur vier der neun Hodentumorbiopsien ließ eine spezifische Methyltrienolon-Bindung erkennen. Diese bewegt sich an der Nachweisgrenze. Die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation zeigt nur im 4S Bereich einen Peak (ohne Abbildung).

3.6.4 Glucocorticoidrezeptor

In allen Tumorextrakten, mit einer Ausnahme, wurden signifikante Mengen an spezifischen Dexamethasonbindungskomponenten gefunden. Ein repräsentatives Profil der Sacharosegradientenzentrifugationsexperimente zeigt Abbildung 26c. In allen analysierten Biopsien sedimentierte die Bindungseinheit als Einzelpeak im 8S Bereich. Die K_D des Dexamethasonbinders lag bei 5×10^{-9} mol/l (Fall 8, Scatchard-Plot nicht dargestellt)

TAB.7 Verteilung von zytoplasmatischen Steroidhormonrezeptoren in Biopsien von humanen Hodentumoren

Fall			Bindungskapazität(fmol/mg Zytosolprotein) ermittelt durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation							
	Alter		17β-ÖSTRADIOL		PROMEGESTON		METHYLTRIENOLON		DEXAMETHASON	
Nr.	(Jahre)	Histologie	4S	8S	4S	8S	4S	8S	4S	8S
1	36	SEMINOM	4	3	4	8	ND	ND	ND	32
2	36	SEMINOM	2	ND	4	ND	1	ND	ND	51
3	33	EMBRIONALES CA.	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	21
4	29	SEMINOM	1	ND	4	ND	2	ND	ND	26
5	17	TERATOM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22
6	22	TERATOM	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	45
7	25	TERATOM	34	ND	ND	ND	2	ND	ND	10
8	31	SEMINOM	ND	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND
9	23	EMBRIONALES CA.	ND	ND	2	ND	3	ND	ND	10

ND= Nicht bestimmbar

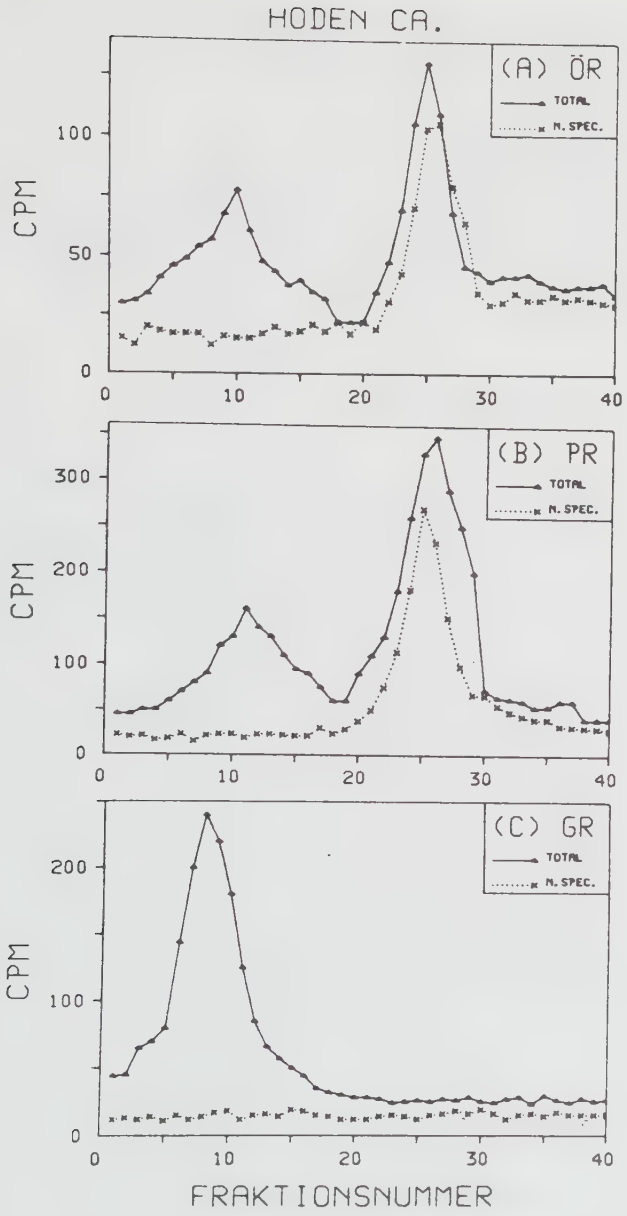


Abb. 26a,b und c zeigt das Sedimentationsverhalten des Östrogen-, Gestagen- und Glucocorticoidbinders im Hodenkarzinom.

3.7 Kolorektale Karzinome

24 kolorektale Karzinome wurden mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation auf Östrogen- und Gestagenrezeptoren hin untersucht. Glucocorticoidrezeptoren wurden in 21 weiteren Tumoren bestimmt. Zum Vergleich wurden die verschiedenen Steroidrezeptoren auch in normalem Mucosagewebe nachgewiesen.

3.7.1 Östrogenrezeptoren

Wie Tabelle 8 zeigt, enthielten 7 der 24 Tumore keine spezifische Östrogenbindungskomponente. In 14 Biopsien wurden nur äußerst geringe (10 fmol/mg Zytosolprotein) Mengen an spezifischem Östrogenbinder nachgewiesen. Nur 3 der 24 Proben enthielten signifikante (10-18 fmol/mg Protein) Quantitäten von Östrogenrezeptoren. Ein original Saccharosedichtegradientenprofil des Falles Nr. 2 aus Tabelle 8 zeigt Abbildung 27 A. Es ist ein geringer Anteil von spezifischer 8S-Bindung zu erkennen. Die weitaus größte Anzahl der untersuchten Proben, die Tabelle 8 zeigt, wiesen ausschließlich 4S-Bindungen auf. Spuren von spezifischer 8S-Bindung wurden nur in 2 Fällen beobachtet. Scatchard Analysen (Fall Nr. 2) ergaben eine hohe Affinität (K_D: 1,5 x 10^{-9} mol/l). Wie Tabelle 8 ebenfalls zeigt, enthält nichtmaligne kolorectale Mucosa nur Spuren von spezifischen Östrogenbindern, die in der 8S-Region sedimentieren.

TABELLE 8. DARSTELLUNG ZYTOSPLASMATISCHER STEROIDREZEPTOREN IN BIOPSIEN MENSCHLICHER KOLOREKTALER KARZINOME

Fall		Bindungskapazität (FMOL/MG Zytosol)	
Nr.	Histologie	E_2	R5020
1	Adeno-Ca	ND	ND
2	Adeno-Ca	6	4
3	Adeno-Ca	ND	17
4	Adeno-Ca	18	3
5	Adeno-Ca	ND	12
6	Adeno-Ca	10	26
7	Adeno-Ca	7	ND
8	Adeno-Ca	11	12
9	Adeno-Ca	2	7
10	Adeno-Ca	2	6
11	Adeno-Ca	2	13
12	Adeno-Ca	ND	66
13	Adeno-ca	4	24
14	Adeno-Ca	1	14
15	Adeno-Ca	2	24
16	Adeno-Ca	2	19
17	Adeno-Ca	ND	14
18	Adeno-Ca	ND	3
19	Adeno-Ca	6	3
20	Adeno-Ca	4	16
21	Adeno-Ca	3	9
22	Adeno-Ca	1	ND
23	Adeno-Ca	ND	12
24	Adeno-Ca	3	ND
25	Mucosa	2	2
26	Mucosa	2	2

3.7.2 Gestagenrezeptoren

Zur Untersuchung der Progesteronrezeptoren in 24 Tumorbiopsien wurden das synthetische Progesteronderivat Promegeston (R 5020) verwendet. Zusätzlich wurden Analysen von zwei verschiedenen nichtmalignen Mucosabiopsien durchgeführt. Tabelle 8 enthält die Daten der durchgeführten Untersuchungen. Die R 5020-Binder Konzentration im Zytosol von 13 Tumoren lag über 10 fmol/mg Zytosolprotein. In nur zwei Fällen wurde eine Konzentration, die über 20 fmol/mg Protein lag, gefunden. In 17 der 20 rezeptorpositiven Zytosole lag das R 5020-Binderprotein nur im 4S-Bereich. Ein typisches Gradientenprofil eines der drei 8S-positiven Tumoren zeigt Abbildung 27 B. Es ist zu sehen, daß selbst bei diesem 8S-positiven Tumorzytosol nur etwa 5% der spezifischen Bindung im 8S-Bereich liegt.
Die Dissoziationskonstante der R 5020-Bindungsreaktion wurde nach der Methode von Scatchard ermittelt und lag im Bereich von 1,5 bis 3,5 x 10^{-9} mol/l. Aus Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß die normale Dickdarmmucosa nur geringe Konzentrationen von spezifischen Progesteronbindungskomponenten enthält. Der Wert liegt an der Grenze des Nachweisbaren und sedimentiert in der Dichtegradientenzentrifugation in der 8S-Region.

3.7.3 Glucocorticoidrezeptoren

Insgesamt 21 Tumore wurden auf spezifische Dexamethasonbindung untersucht. In 3 dieser Tumoren wurde die Dexamethasonbindung in verschiedenen Arealen untersucht. Zum Vergleich wurden 6 Biopsien nichtmaligner Kolonmucosa analysiert. Die Bindungsdaten sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Alle Tumorextrakte enthielten signifikante Mengen von spezifischen Dexamethasonbindern, die ausschließlich in der 8S-Region (Abbildung 27 C) sedimentierten. Die K_D des Dexamethasonbindungskomplexes lag bei 5 x 10^{-9} mol/l.

lag bei 5×10^{-9} mol/l.
Die mehrfachen Untersuchungen in verschiedenen Tumorarealen ergaben eine deutliche Heterogenität der Rezeptorverteilung. Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, lassen sich auch in nichtmalignem Dickdarmgewebe deutliche Mengen von Glucocorticoidrezeptoren nachweisen.

TABELLE 9. DARSTELLUNG DER ZYTOPLASMATISCHEN GLUCOCORTICOIDREZEPTOREN IN BIOPSIEN MENSCHLICHER KOLOREKTALER KARZINOME

Fall				Bindungskapazität (FMOL/MG Zytoso
Nr.	Alter (Jahre)	Geschlecht	Histologie	Dex
40	56	♀	Adeno-Ca	88
41	73	♂	Adeno-Ca	51
42	43	♀	Adeno-Ca	70
43	77	♀	Adeno-Ca	78
44	65	♀	Adeno-Ca	81
45	57	♂	Adeno-Ca	68
46a	75	♀	Adeno-Ca	80
46b				55
47	84	♀	Adeno-Ca	77
48	54	♀	Adeno-Ca	143
49	52	♂	Adeno-Ca	82
50	66	♀	Adeno-Ca	41
51	71	♂	Adeno-Ca	25
52	68	♂	Adeno-Ca	48
53	85	♂	Adeno-Ca	46
54	63	♂	Adeno-Ca	50
55a	67	♂	Adenom	37
55b				70
56a	53	♂	Adeno-Ca	143
56b				69
57	57	♂	Adeno-Ca	88
58	68	♀	Adeno-Ca	46
59	67	♂	Adeno-Ca	107
60	65	♀	Adeno-Ca	110
48	54	♀	Mucosa	192
51	71	♂	Mucosa	47
52	68	♂	Mucosa	76
40	56	♀	Mucosa	161
54	63	♂	Mucosa	97
59	67	♂	Mucosa	78

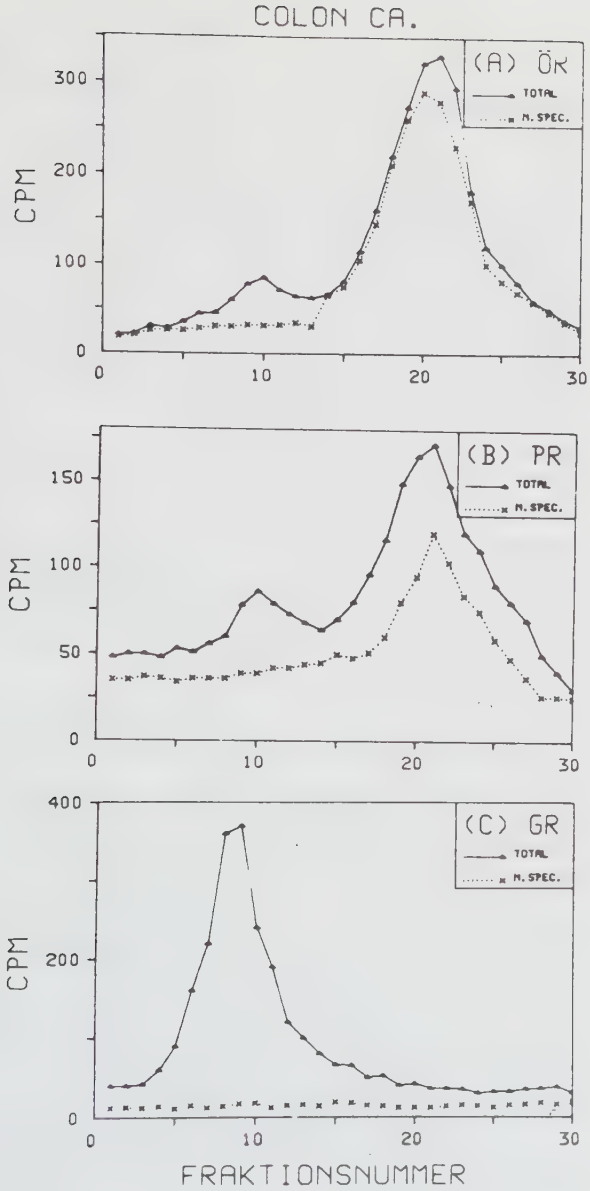


Abb. 27a,b und c zeigt das Sedimentationsverhalten des Östrogen-, Gestagen- und Glucocorticoidbinders in kolorektalen Karzinomen.

3.8 Lebertumoren

Biopsien aus fokal-nodulären Hyperplasien (FNH) der menschlichen Leber wurden auf Vorhandensein von Östrogen-, Gestagen- und Glucocorticoidrezeptoren hin untersucht. Als Methoden wurden die Gradientenzentrifugation, Titrationsanalyse und Spezifitätsstudien (letztere nur für Östrogen- und Gestagenrezeptoren) angewendet. Neben den FNH Untersuchungen wurden zum Vergleich Experimente mit Normalleber und einem primären Leberzellkarzinom durchgeführt.

3.8.1 Östrogenrezeptoren

Wie Tabelle 10 zeigt, enthalten Zytosolpräparationen aus menschlicher FNH spezifische Östrogenbindungskomponenten in geringer Konzentration (3-12 fmol/mg Zytosolprotein). Im Vergleich hierzu zeigen die Analysen von Normalleber und Leberzellkarzinomen ebenfalls eine geringe Östrogenbindungsaktivität. Ein typisches Sedimentationsprofil für den Östrogenbinder zeigt Abbildung 28a. Die spezifische Bindung berechnet sich aus der Differenz der Fläche unter einem Peak ohne und mit einem Überschuß an Diäthylstilböstrol. Sie liegt überwiegend im 4S-Bereich, zeigt aber auch einen deutlichen Anteil in der 8S Region. Jedoch variierten die Anteile von 10% (Fall Nr. 1) bis 60% (Fall Nr. 4). Die mit dem Zytosol aus Fall Nr. 5 durchgeführte Scatchard Analyse ergab eine K_D von 2×10^{-9} mol/l. Die relative Verdrängungsaktivität von verschiedenen Hormonen gegenüber tritiiertem 17ß-Östradiol zeigt Tabelle 12. Es ist zu sehen, daß die Bindung des radioaktiven Hormons durch die verschiedenen aktiven Östrogene kompetiert werden kann. Im Gegensatz dazu sind Steroide ohne östrogen Eigenschaften keine signifikanten Kompetitoren.

Tab. 12 Ligandenspezifität der [^{3}H]17ß-Östradiol und [^{3}H]ORG 2058 Bindung im Zytosol aus FNH

Kompetitor	% Bindung von [^{3}H]17ß-Östradiol	% Bindung von [^{3}H]ORG 2058
ohne	100	100
17ß-Östradiol	46	91
Östriol	47	92
Diäthylstilbestrol	55	96
Aldosteron	93	96
Cortisol	93	96
R 5020	94	88
Medroxyprogesteronacetat	96	42
Testosteron	95	21
Progesteron	95	12
ORG 2058	94	13

3.8.2 Gestagenrezeptoren

Bei der Verwendung von radioaktivmarkiertem Org 2058 als Ligand für die Gestagenrezeptoranalyse in Kombination mit unmarkiertem Org 2058 zur Untersuchung der nichtspezifischen Bindung zeigten alle FNH-Extrakte hohe Konzentrationen an spezifischen Bindungskomponenten. Hohe Konzentrationen des spezifischen Org 2058-Binders konnten ebenfalls in normalem Lebergewebe im Fall 4 nachgewiesen werden, während das Leberkarzinom (Fall 6) nur niedrige Quantitäten des Org 2058-Binders aufwies. Wie im repräsentativen Isotopenprofil von Abbildung 28b gezeigt, sedimentierten Org 2058 Binder ausschließlich im 4S-Bereich. Die K_D des Org 2058-Bindungskomplexes, mittels Scatchard-Plot errechnet, lag im Bereich von 4 - 14 x 10^{-8} mol/l (ohne Abbildung).

Tab. 10 Spezifische Steroidhormonbindung in focalen nodulären Hyperplasien im Vergleich zur Normalleber und Leberzellkarzinom

Fall			Histologie	Bindungskapazität (fmol/mg Zytosolprotein)		
Nr.	Alter	Geschlecht		17β-Östradiol	ORG 2058	Dexamethason
1	23	♀	FNH	3	405	97
2	45	♀	FNH	8	294	100
3	29	♀	FNH	12	205	50
4	28	♀	FNH	9	514	152
			NL	8	244	92
5	41	♀	FNH	3	211	46
	22	♀	FNH	3	112	25
6	65	♂	LZK	2	2	113

Um die Bindungsspezifität von Org 2058 näher zu charakterisieren, wurde die relative Affinität verschiedener Steroidhormone für den Org 2058-Binder durch Kompetitionsanalysen untersucht (Tabelle 12). Wenn man für den unmarkierten Kompetitor eine Konzentration von 1 µmol/l verwendete, konnte die Bindung des tritiierten Org 2058 nur mit unmarkiertem Org 2058, Progesteron, Testosteron, Medroxyprogesteronacetat und Promegeston kompetiert werden, wobei die verschiedenen Kompetitoren eine unterschiedliche Verdrängungsaktivität zeigten. Alle getesteten Östrogene, das Aldosteron und Cortisol, konnten die (^{3}H) Org 2058-Bindung nicht signifikant beeinflussen. Wie aus Abbildung 29 zu entnehmen ist, stellte sich Progesteron neben dem Org 2058 als effektivster Kompetitor des tritiierten Org 2058 heraus. Die Bindung des radioaktiven Liganden wurde ebenfalls durch unmarkiertes Testosteron und 5-alpha-Dihydrotestosteron signifikant unterdrückt. Das 5-beta-Isomere des Dihydrotestosterons, Medroxyprogesteronacetat, Promegeston (R 5020) und das synthetische Androgen Methyltrienolon (R 1881) stellten sich als weniger effektive Kompetitoren heraus. Triamcinolonacetonid wirkte nicht kompetitiv.
Tabelle 11 zeigt einen Vergleich der Ligandenspezifität der (^{3}H) Org 2058-Bindung in FNH- und Kalbsuteruszytosol. Deutliche Unterschiede wurden gefunden in der Affinität von R 5020, R 1881, Testosteron und 5alpha-DHT für den hepatischen und uterinen Org 2058-Binder. Sowohl R 5020 als auch R 1881, leichte Kompetitoren des Org 2058 Binders im FNH Zytosol, zeigten eine starke Inhibition der Bindungsreaktion im Uteruszytosol. Im Gegensatz hierzu zeigten Testosteron und 5-alpha-DHT deutlich geringere Inhibition der Org 2058 Bindung im Kalbsuteruszytosol im Vergleich zur FNH.

Tab. 11 Vergleich der Ligandenspezifität der ORG 2058 Bindung in FNH und Kälberuteruszytosol

	^{3}H ORG 2058 Bindung (%)	
Kompetitor	FNH	Uterus
ohne	100	100
ORG 2058	13	5
Progesteron	12	7
R 5020	88	7
Testosteron	21	88
alpha-DHT	20	74
R 1881	86	10

3.8.3 Glucocorticoidrezeptoren

Wie Tabelle 8 zeigt, enthält normale Leber, das Leberzellkarzinom, ebenso wie die FNH deutliche Mengen von spezifischen Dexamethasonbindern. Ein repräsentatives Isotopenprofil des zytosolischen (^{3}H)-Dexamethasonbinders zeigt Abbildung 28c. Der Binder sedimentiert in der Dichtegradientenzentrifugation ausschließlich im 8S-Bereich.

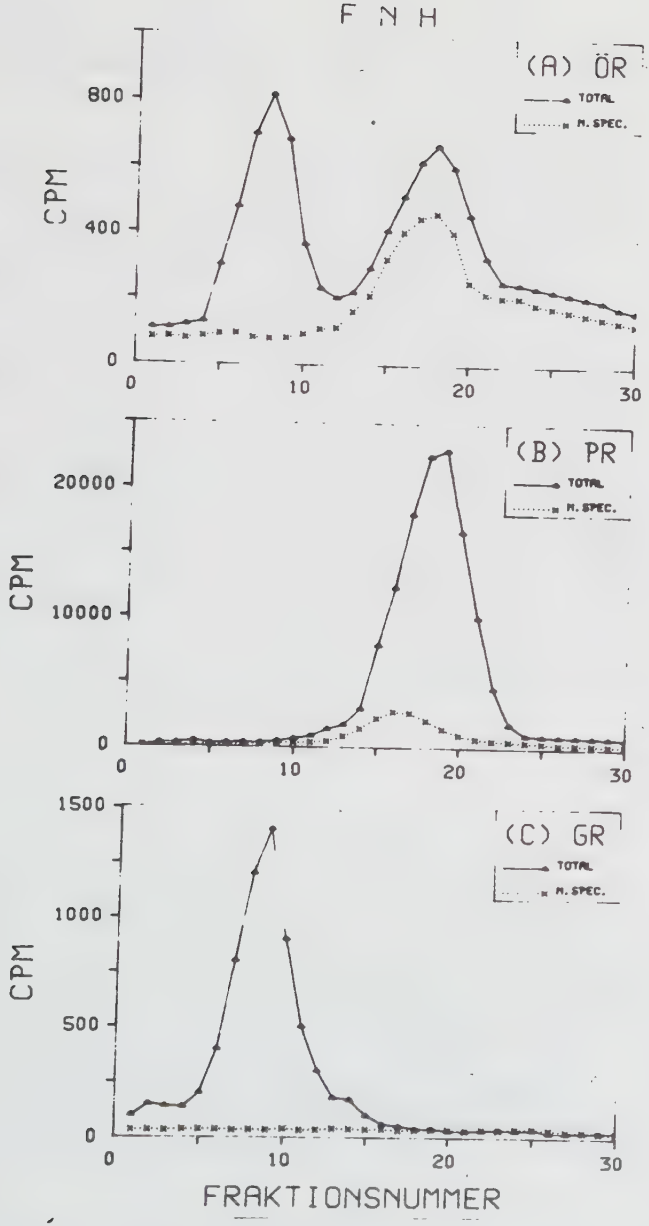


Abb. 28a,b und c zeigt das Sedimentationsverhalten des

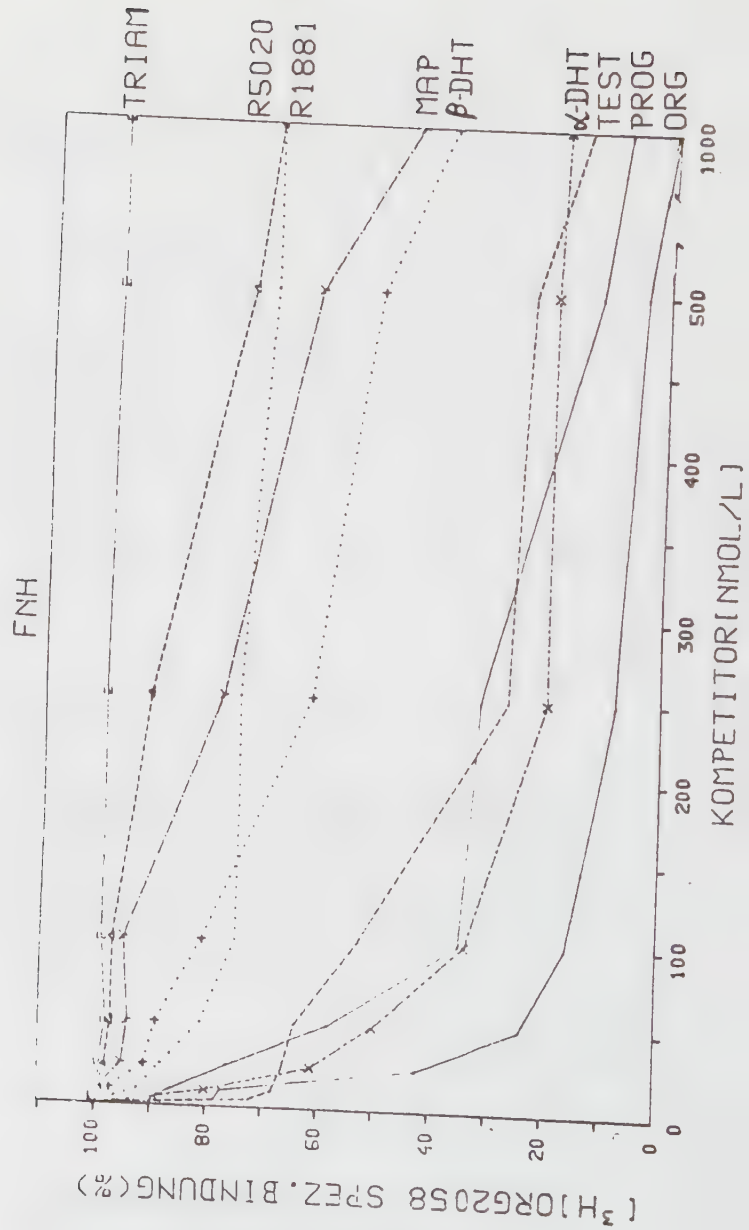


Abb. 29 zeigt die Kompetitionsuntersuchung des [^{3}H]-Org 2058-Binders in der menschlichen FNH.

4. Diskussion

4.1 Automatisierte Rezeptoranalytik

Mit der Steroidrezeptoranalytik steht dem klinisch tätigen Arzt heute ein Verfahren zur Verfügung, das es erlaubt, mit beträchtlicher Sicherheit praetherapeutisch die endokrine Abhängigkeit individueller Mammakarzinome zu bestimmen (De Sombre 1979, Maass 1980). Zur Zeit verfügen nur wenige Zentren über die technologische Voraussetzung zur Rezeptoranalytik. Darüber hinaus haben Ringversuche gezeigt (Bojar 1982c), daß die Richtigkeit und Reproduzierbarkeit bei vielen Laboratorien, die gelegentlich die Rezeptoranalytik betreiben, großen Schwankungen unterliegen. Aus diesen Gründen sollte die Rezeptoranalytik so weit wie möglich standartisiert werden. Das entwickelte automatische Analysen- und Auswertesystem ist in der Lage, die Steroidrezeptoranalyse beim Mammakarzinom mit größtmöglicher Genauigkeit und darüberhinaus mit hoher Frequenz durchzuführen.
Aufgrund der Präzision, mit der Rezeptoranalysen durchgeführt werden können, war es möglich, eine Reihe wissenschaftlicher Fragestellungen zu beantworten.

4.2 Fluoreszenzuntersuchungen

Histochemische Untersuchungen sind von mehreren Autoren beschrieben worden (Lee 1978, Pertschuk 1979, Rao 1980 und Walker 1980). Dabei wird die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der histochemischen und biochemischen Methode von den verschiedenen Autoren sehr unterschiedlich beurteilt. Sie schwanken von sehr gut bis sehr schlecht (Pertschuk 1979, Remmele 1982)
Die eigenen Untersuchungen stellen die Möglichkeit des Rezeptornachweises mit histochemischen Methoden sehr in Frage.

Zum gleichen Ergebnis kommt auch Daxenbichler (1982b). Nachdem er 1979 und 1980 gute Korrelationen zum biochemischen Assay fand, kommt er in neueren Untersuchungen zu dem Schluß, daß ein Rezeptornachweis mittels histochemischer Methoden selbst theoretisch nicht möglich ist.

Meine Untersuchungen zeigen, daß histochemische Untersuchungen keine Alternative zu den klassischen biochemischen darstellen. Gründe hierfür sind:

1. Die Einlagerung der fluoreszierenden Steroidderivate erfolgt nicht nach den Gesetzen der Rezeptorbindung (keine Kompetition möglich).
2. Die Empfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden ist zu gering, um die relativ kleine Zahl der Rezeptorbindungsstellen nachzuweisen.
3. Es besteht die Gefahr, daß der Rezeptor bei der histochemischen Technik herausgewaschen wird.
4. Die beobachtete Fluoreszenz entspricht einem Vielfachen der Rezeptorkonzentration.

4.3 Thermostabile Rezeptorpräparationen

Zytosolische Steroidrezeptoren sind in vitro als äußerst labile Proteine bekannt. Bei 0^{o} C sinkt die Bindungskapazität nach 10 Stunden auf etwa 40% des Ausgangswertes. Bei Temperaturen von etwa 37^{o} C entstehen in der ersten Stunde Bindungskapazitätsverluste von über 70%. Als Gründe hierfür sind neben thermischer Denaturierung die Spaltung durch endogene Proteasen zu nennen. Durch Zusatz von Proteaseinhibitoren zum Zytosolpuffer kann die Stabilität der Rezeptoren nur geringfügig verbessert werden.
Zur Kontrolle und Vereinheitlichung der Rezeptoranalytik war die Entwicklung eines stabilen Standards notwendig. Erste Versuche wurden mit tierischen Zielgeweben (z.B. Rattenuteri) durchgeführt.
Durch Lyophilisation von pulverisiertem Kalbsuterusgeweben gelang es Bojar et al (1980) ein Präparat herzustellen, dessen Rezeptorkonzentration auch nach längerer Lagerung bei Zimmertemperatur nicht wesentlich abfiel. Um eine Standardlösung zu erhalten, mußte es jedoch mit Puffer extrahiert werden. Die mit dem Extrakt durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß die Eigenschaften der Östrogen-, Gestagen-, Glucocorticoid- und Androgenrezeptoren sich nicht von frisch gewonnenem Kalbsuteruszytosol unterscheiden. Alle vier Rezeptorspecies sedimentieren fast ausschließlich im 8S-Bereich. Nur der Gestagenrezeptor zeigte einen kleinen 4S-Peak. Die scheinbaren Dissoziationskonstanten für den Östrogenrezeptor lagen im Bereich von $3,3 - 5,3 \times 10^{-9}$ mol/l, für den Androgenrezeptor zwischen $1,8 - 2,5 \times 10^{-9}$ mol/l und für den Glucocorticoidrezeptor bei $1,3 - 2,8 \times 10^{-9}$ mol/l.
Das Erhitzen des Pulvers auf bis zu 80^{o} C (16 Stunden) bewirkte im wesentlichen quantitative Veränderungen, wie

anschließend die durchgeführten Rezeptoruntersuchungen zeigten. Die scheinbaren Dissoziationskonstanten wurden nur geringfügig größer, die Bindungskapazität beim Östrogenrezeptor nahm um etwa 36% ab. Die spezifischen Androgen-, Glucocorticoid- und Gestagenbinder waren noch stabiler gegenüber Hitzedenaturierung, nur 19% des Androgenrezeptors, 27% des Glucocorticoidrezeptors und 28% des Progesteronrezeptors wurden inaktiviert.

Die von mir entwickelten Rezeptorpräparationen zeichnen sich u.a. durch einfaches 'handling' aus. Zur Rezeptoranalyse müssen keine aufwendigen Extraktions- und Zentrifugationsschritte vorgeschaltet werden. Durch einfaches Auflösen in eiskaltem Wasser bzw. 5%tigem wässrigem Glycerin ist die Referenzlösung herzustellen. Die Gradientenprofile vom Östrogen- und Glucocorticoidrezeptor entsprechen denen aus frisch gewonnenem Kalbsuteruszytosol. Da auch die scheinbaren Dissoziationskonstanten durch das Herstellungsprocedere nicht wesentlich verändert werden, kann geschlossen werden, daß diese beiden Rezeptoren in lyophilisiertem Zustand besonders stabil sind.

Leichte Veränderungen im Sedimentationsprofil zeigt der Progesteronrezeptor. Im Gegensatz zu frisch gewonnenem Zytosol zeigt sich eine Schulter etwa im 6S-Bereich. Bei der Aufarbeitung scheint zum Teil eine leichtere Rezeptoreinheit entstanden zu sein. Es zeigt sich in diesem Bereich jedoch keine vermehrte unspezifische Bindung. Da auch die Dissoziationskonstante keine Unterschiede aufweist, folgt daraus, daß das niedermolekulare Rezeptorprotein keine veränderten Bindungseigenschaften aufweist. Die deutlichsten Unterschiede im Sedimentationsprofil zeigt der Androgenrezeptor. Aus der ursprünglich ausschließlich im 8S-Bereich gelegenen spezifischen Bindung ist eine breite, über den gesamten Sedimentationsbereich verteilte Bindung geworden. Jedoch ist die scheinbare Dissoziationskonstante nur unwesentlich verändert, so daß gravierende Änderungen der

Bindungseigenschaften nicht erfolgt sind.
Erwartungsgemäß sind die Rezeptoren im lyophilisierten Kalbsuteruszytosol nicht so temperaturstabil wie in einfach gefriergetrocknetem Kalbsuteruspulver. Bei dem Erwärmen auf 60° C (18 Stunden) ist dieser Unterschied jedoch noch nicht signifikant. Erst bei Temperaturen von 80° C (18 Stunden) treten deutliche Unterschiede auf. Die Gradientenprofile meiner Rezeptorpräparationen sind unter diesen Bedingungen völlig uncharakteristisch. Die Bindungskapazitätsverluste liegen mit Ausnahme des Östrogenrezeptors über den entsprechenden im lyophilisierten Uteruspulver. Bei der Glucocorticoidbindung ist keine spezifische Bindung mehr nachweisbar (Vergleich Uteruspulver: Restaktiviät 73%!), auch bei dem Androgenrezeptor ist die Restaktiviät mit etwa 2% im Vergleich zu 81% im Uteruspulver gering.
Der Progesteronrezeptor liegt mit einer Wiederfindungsrate von etwa 20% schon näher an dem Vergleichswert im Pulver (72%).

Erstaunlicherweise ist der im Uteruspulver thermolabilste Rezeptor, nämlich der Östrogenbinder, in der gefriergetrockneten Zytosolfraktion am thermoresistentesten. Der Verlust der maximalen Bindungskapazität beträgt nach Erhitzen auf 80° C für 18 Stunden nur 21%. Er ist damit geringer im Vergleich zu dem Pulver. Da die spezifische Bindung bei der Gradientenzentrifugationen wie bei allen anderen gemessenen Steroidrezeptoren über den Gesamtbereich verteilt ist, scheint eine Sonderstellung in Bezug auf Temperaturstabilität des Östrogenrezeptorproteins ausgeschlossen zu sein. Es scheint vielmehr, daß bei der temperaturinduzierten Spaltung und eventuellen Rekombinationen das 17ß-östradiolbindende Zentrum zu einem großen Teil erhalten bleibt.

4.4 Mammakarzinom

Obwohl die Rezeptoranalytik beim Mammakarzinom seit Jahren durchgeführt wird (Jensen et al 1982) gibt es eine Vielzahl ungeklärter wissenschaftlicher Fragestellungen. Die Verteilung der Östrogen- und Progesteronrezeptoren in dem von mir untersuchten Material entspricht weitgehendst den Angaben in der Literatur. So schwankt der Prozentsatz von Tumoren mit positivem ÖR und PR zwischen 46% und 55% (Bloom et al 1980 Koenders et al 1980, McGuire 1980). Die eigenen Untersuchungen ergaben bei einem Anteil 50% bei den Primärtumoren und nur 38% bei Metastasen. Mit 27% der völlig rezeptornegativen Tumore unterscheiden sich meine Daten von denen, die McGuire (1982) veröffentlichte. Er bezeichnete nur 20% seiner Tumore als rezeptornegativ. Die 17% ÖR+/PR-positiven Tumore besitzen wahrscheinlich ein gestörtes 'processing' (Horwitz und McGuire 1978). Hierfür spricht die mit 30% geringe Ansprechrate auf endokrine Therapie.

Der Anstieg der Östrogenrezeptorkonzentration mit dem Alter ist nur schwer zu erklären. Der Östrogen- und Gestagengehalt im Blut nimmt bei Frauen nach der Menopause stark ab. Die Blutspiegel liegen nur noch bei 15-20% im Vergleich zum praemenopausalen Status (Longcope 1978). Ab ca. 50 Jahren bleiben die Steroidgehalte im Blut relativ konstant (Meldrum 1981). Östrogene sind eher vom Gewicht als vom Alter abhängig. Ein Anstieg der Östrogenrezeptoren im postmenopausalen Alter ist vielleicht mit dem Abfall der Östrogene, und damit einem Anstieg der nichtbesetzten zytosolischen Rezeptoren zu erklären.

Versuche, die Rezeptorkonzentration am Operationstag mit den jeweiligen Steroidkonzentrationen zu korrelieren, schlugen fehl. Reiner et al (1981) fanden keinen Zusammenhang von LH-, FSH-, Östradiol-, Progesteron- und Testosteron- Konzentrationen im Blut mit dem Rezeptorgehalt primärer Mammakarzinome. Die

quallitative Abhängigkeit der Gestagenrezeptoren von den Östrogenrezeptoren konnte eindeutig gezeigt werden. Je größer der Östrogenrezeptorgehalt in einem Mammakarzinom war, je höher war die Wahrscheinlichkeit, einen PR+ zu finden.
Eine lineare Abhängigkeit der Konzentration von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, wie sie von Raynaud (1977) beschrieben wurde, bzw. eine logarithmische, wie sie Jonat (1982) beschrieben, konnte nicht gefunden werden. Solche Korrelationen sind meiner Meinung nach allenfalls im in vitro Modell bei MCF-7-Mammakarzinomzellen in Kulturen (Horwitz und McGuire 1978) möglich.
Wenn der Gestagenrezeptor beim Mammakarzinom wie beim Hühnereileiter (O`Malley 1969) und bei der MCF-7-Zellinie unter der Kontrolle des Östrogenrezeptors steht, dürfte der ÖR-/PR+ Befund nicht vorkommen. Trotzdem wird von vielen Autoren zwischen 3 und 10% ÖR-/PR+ Rezeptorkonstellationen angegeben (McGuire 1977, Nagai 1979 und Pollow 1977).
Neben Fehlmessungen sind mehrere Gründe möglich:

1. Die zytosolischen Östrogenrezeptoren sind durch endogene Östrogene besetzt bzw. in den Kern transloziert.
2. Die gemessenen Bindungskomponenten für die Gestagene sind keine Rezeptoren im klassischen Sinne.
3. Im Rahmen der Entdifferenzierung hat sich die Gestagenrezeptorsynthese verselbständigt.

Bei der formalen Betrachtung der ÖR und PR mit einem 'cutoff' Punkt von 10 fmol/mg Zytosolprotein waren in meinem Untersuchungsmaterial etwa 5% der Gruppe ÖR-/PR+ zuzuordnen. Dies steht im Einklang mit Berichten o.g. Autoren. Zieht man das Sedimentationsverhalten bei der Beurteilung der Rezeptorpositivität hinzu, findet man einen bedeutenden Anteil von Tumoren, deren Bindingskapazität zwar kleiner als 10 fmol/mg Protein ist, das Sedimentationsverhalten (überwiegend 8S-Bindung) jedoch auf einen intakten Östrogenrezeptor hindeutet. Bei einem anderen Teil der ÖR-/PR+ Gruppe wurde zwar eine Bindungskapazität größer als 10 fmol/mg gefunden, jedoch

zeigte sich nur 4S-Bindung in der Gradientenzentrifugation . Ordnet man nun Tumore mit geringen Bindungskapazitäten, aber typischem Sedimentationsverhalten, ÖR+/PR+ Gruppe, und umgekehrt Progesteronrezeptoren mit nachweisbarer Bindungskapazität, aber atypischem Sedimentationsverhalten, der ÖR-/PR- Gruppe zu, reduziert sich in meinem Untersuchungsmaterial die Gruppe der ÖR-/PR+ Tumore auf ca. 1%. Diese Größenordnung als Verselbständigung der Gestagenrezeptorsynthese im Rahmen einer Entdifferenzierung gewertet werden.

Signifikante, saisonale Schwankungen des ÖR, wie sie von Hughes et al (1976) beobachtet wurden, konnten nicht bestätigt werden. Selbstverständlich gibt es Schwankungen der durchschnittlichen Rezeptorkonzentration innerhalb eines Jahres, jedoch zeigt die Betrachtung eines folgenden Jahres ein abweichendes Bild. Der von Jungblut (1976) beobachtete kurze Zeitraum und das vergleichsweise kleine Kollektiv waren wohl Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse. Saisonale Schwankungen der Östrogenspiegel als mögliche Ursache für ÖR-Schwankungen sind nur bei praemenopausalen Frauen (Testart et al 1982) beschrieben worden. Bei postmenopausalen Frauen, die das größte Kollektiv der Mammakarzinompatientinnen darstellen, wurden keine jahreszeitlichen Einflüsse (Meldrum et al 1981) auf den Steroidhormonblutspiegel beobachtet.

In etwa 20% der Metastasen ist mit einem abweichenden Rezeptorstatus vom Primärtumor zu erwarten. Dabei ist in den überwiegenden Fällen mit einem Rezeptorverlust zu rechnen. Gründe hierfür können einmal ein Rezeptorverlust im Rahmen einer weitergehenden Entdifferenzierung bei der Metastasierung sein, zum anderen wird immer wieder die Möglichkeit der Mosaikstruktur (rezeptorpositive neben rezeptornegativen Zellen) des Primärtumors diskutiert. In diesem Falle wäre das (bevorzugte?) Metastasieren rezeptornegativer Zellen möglich. Eine Entstehung von rezeptorpositiven Zellen ist nach dem gleichen Mechanismus denkbar. In meinen Proben befand sich nur

eine einzige ÖR+/PR+ Metastase, deren Primärtumor ÖR-/PR- war. Neben der o.g. Entstehungsmöglichkeit kann auch die durchgeführte Therapie einen Einfluß ausgeübt haben. Die Patientin ist mit Tamoxifen (einem Antiöstrogen mit z.T. östrogenen Eigenschaften) behandelt worden. Hierdurch ist eine Stimulierung der potentiell vorhandenen Rezeptorsynthese denkbar.

4.5 Ovarialkarzinom

Ob Hormone das Wachstum oder die Ausbreitung von Ovarialkarzinomen beeinflussen, ist nicht geklärt. Der experimentelle Beweis, daß Hormone die Zellproliferation im Ovarialkarzinom regulieren ist noch nicht erbracht. Davy (1977) berichtete über FSH Rezeptoren in einem Granulosazelltumor. LH (hCG) Rezeptoren sind von Rajaniemi et al (1981) in 27% von 26 malignen Ovarialtumoren nachgewiesen worden. Jedoch war die LH-Rezeptorkonzentration so klein, daß die Vermutung geäußert wurde, sie könne dem normalen Ovarialgewebe zuzuordnen sein, das sich ebenfalls in der Biopsie befand. Bohnet (1981) konnte in einem Dysgerminon und in zwei undifferenzierten Ovarialkarzinomen weder Prolactin-, LH- noch FSH-Rezeptoren nachweisen.
Im Gegensatz hierzu konnten von einigen Laboratorien (Holt et al 1981, Bibro et al 1979, Stedman et al 1980) im Tumorzytosol spezifische Bindungsstellen für verschiedene Steroidhormone nachgewiesen werden.
Der Prozentsatz der ÖR+ Tumore lag zwischen 25 und 100%, beim Progesteronrezeptor wurden Bereiche von 0-100% in der Literatur angegeben. Androgen- und Glucocorticoidrezeptoren wurden in 70-90% der untersuchten Tumoren beschrieben.
Die berichteten Daten müssen kritisch betrachtet werden, da die Rezeptornatur der Bindungsstellen in den einzelnen Arbeiten bisher noch nicht eindeutig bewiesen wurde.
Aufgrund der Ergebnisse der Scatchard-Analysen,

Dichtegradientenzentrifugation und Kompetionsstudien konnte der Östrogenbinder als 'Rezeptor' charakterisiert werden. Das Bindungsprotein sedimentierte im 8S- bzw. 8S-und 4S-Bereich. Die Dissoziationskonstante lag in der gleichen Größenordnung wie bei endokrinabhängigen menschlichen Mammakarzinomen (Wittliff 1972). Auch sprach die Ligandenspezifität (Abb. 22) für einen Östrogenrezeptor. Daß das Testosteron nicht die 17ß-Östradiol-Bindung kompetitiert, spricht eindeutig gegen die Vermutung, SHGB könne die Bindungskomponente sein. Darüberhinaus spricht auch das Sedimentieren im 8S-Bereich gegen eine SHGB-Bindung.

Die teilweise Charakterisierung des Progesteronrezeptors erfolgte durch Äquilibriumsuntersuchungen und durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Die Bindung zeigt sich im 8S-und 4S-Bereich. Die K_D lag bei etwa 10^{-9} mol/l.

Aufgrund der ermittelten Daten muß man in einem Teil der epithelialen Ovarialkarzinome Östrogen- und Gestagenrezeptoren erwarten. Jedoch bedeutet das Vorhandensein nicht automatisch auch eine Wachstumsabhängigkeit. Obwohl nach Berichten von Holt (1981) der Östrogenrezeptorkomplex in den Zellkern transloziert wird und dort auch bestimmte Genaktivitäten (u.a. Progesteronrezeptor, Peroxidase) entfaltet, muß noch geklärt werden, ob Östrogene über den Rezeptormechanismus die Proliferationsaktivität der Ovarialkarzinome beeinflussen. Diese Information kann jedoch nicht durch biochemische Rezeptoruntersuchungen erfolgen. Bisher gibt es keine zuverlässigen Untersuchungen über Wachstumsstimulation von Ovarialkarzinomen durch Östrogene. Darwish (1978) untersuchte zwar den Effekt von 17ß-Östradiol und Progesteron auf die DNA-Synthese in Zellkulturen aus Ovarialkarzinomen. Jedoch war die Hormonkonzentration so hoch gewählt ($E_2 = 6 \times 10^{-5}$ mol/l), daß nicht sichergestellt ist, daß die gemessenen Effekte auf spezifische Hormonwirkungen zurückzuführen sind. Als Modell für die in vitro Untersuchungen zur weiteren

Abklärung bietet sich der Stammzellassay (Salmon 1980) an. In vitro Studien könnten darüberhinaus auch am Nacktmausmodell durchgeführt werden, um eine weitere Abklärung zu erreichen.

4.6 Hodentumoren

Im Gegensatz zu den Ovarialkarzinomen, die deutliche Mengen an Östrogen-, Gestagen-, Androgen- und Glucocorticoidrezeptoren (Bojar et al 1983, Würz 1983) enthalten, scheinen Hodentumoren in der Regel nur signifikante Glucocorticoidrezeptoren zu enthalten. Obwohl einer der untersuchten Tumoren eine deutliche Östrogenbindungsaktivität aufwies, muß die Rezeptornatur dieser Bindungsstellen aufgrund des nichtvorhandenen 8S-Rezeptors in der Dichtegradientenzentrifugation in Frage gestellt werden. Nur einer der untersuchten Tumorextrakte enthielt eine geringe, spezifische 8S-Bindung. Wenn man jedoch die Grenze für einen rezeptorpositiven Tumor bei 10 fmol/mg Zytosolprotein, wie beim Mammakarzinom üblich, legt, muß auch dieser Tumor als östrogenrezeptornegativ eingestuft werden.
Der einzige Tumor mit 8S-Bindung für den Gestagenrezeptor hatte eine Bindungskapazität von 12 fmol/mg Protein. Er muß also als grenzwertig eingestuft werden.
Die Untersuchungsergebnisse des Androgenrezeptors sind eindeutig. Alle Tumore zeigten keine 8S-Bindung. Die 1-3 fmol/mg Protein 4S-Bindung in 4 Fällen liegt an der Grenze des Nachweisbaren. Interessanterweise ist die Mehrzahl der untersuchten Hodentumoren glucocorticoidrezeptorpositiv. Hieraus könnte sich ein Ansatzpunkt für die Therapie ergeben. Jedoch müssen noch weitere Unterschungen durchgeführt werden, um den rezeptorvermittelten Einfluß von Glucocorticoid auf die Proliferationsaktivität von Hodenkarzinomen abzuklären. Ein gutes Modell hierfür scheint auch dabei der Hamburger-Salmon Assay (1977) zu sein, da sich hiermit Wachstumsstimulation von Wachstumsinhibition abgrenzen läßt.

4.7 Kolorektale Tumore

Steroidhormonrezeptoren haben eine intrazelluläre Schlüsselfunktion für den Mechanismus und die Wirkung der Steroidhormone. Die Anwesentheit der Rezeptorproteine ist auf Zielzellen für das entsprechende Hormon beschränkt. Bei der malignen Zelltransformation besteht entweder die Möglichkeit, daß die Zelle die Fähigkeit zur Synthese des Rezeptorproteins behält oder verliert. Bei dem Verlust der Fähigkeit zur Rezeptorsynthese geht gleichzeitig die Hormonempfindlichkeit verloren. Beim Mammakarzinom konnte eindeutig gezeigt werden, daß Hormonrezeptoren verläßliche Indikatoren (Jensen 1978, McGuire 1979) für eine endokrine Therapierbarkeit des fortgeschrittenen Mammakarzinoms sind. Berichte in der Literatur (Lippman et al 1979, Sica 1981) deuteten daraufhin, daß kolorektale Karzinome ebenfalls verschiedene Steroidrezeptoren beinhalten. Aufgrund dieser Daten kann man eine Schlüsselfunktion der Steroidhormone für die Entstehung und das Wachstum der kolorektalen Karzinome vermuten. Bei der willkürlich festgelegten Grenzkonzentration von 10 fmol/mg Zytosolprotein bezeichnet. Alford (1975) 30% und Sica (1981) 50% seiner untersuchten kolorektalen Karzinombiopsien als östrogenrezeptorpositiv. Im Gegensatz hierzu konnte ich bei meinen Untersuchungen bei gleichen Kriterien für einen positiven Befund nur 13% der untersuchten Tumorextrakte als östrogenrezeptorpositiver bezeichnen. Bei einer Grenzkonzentration von 3 fmol/mg Protein für Rezeptorpositivität fanden Agrez und Spencer (1982) ungefähr 7% östrogenrezeptorpositive Dickdarmmalignome. Trotz Anwesentheit des Proteaseinhibitors Natriummolybdat im Puffersystem bei der Rezeptoranalytik konnte keine spezifische 8S-Bindung in den wenigen rezeptorpositiven Tumorzytosolen nachgewiesen werden. Diese Beobachtung steht in gutem Einklang mit Berichten von Sica et al (1981) und Kiang und Kennedy

(1977). Beide Arbeitsgruppen konnten ebenfalls keinen 8S-Östrogenbinder in kolorektalen Karzinomen finden. Etwa 50% der von ihnen untersuchten kolorektalen Karzinome bezeichneten Lippman et al (1979) und Sica et al (1981) als gestagenrezeptorpositiv. Dabei basierten beide Berichte auf etwas unterschiedlichen 'cutoff' Punkten. Ich konnte ebenfalls bei dem Zugrundelegen der Grenzkonzentration von 10 fmol/mg Protein in etwa 50% der untersuchten Fälle einen positiven Rezeptorbefund ermitteln. Es wurden jedoch in allen diesen Fällen, trotz Anwesentheit des Proteaseinhibitors Natriummolybdat, keine signifikanten 8S-Bindungsproteine gefunden. Weder aus meinen Daten noch aus bisher in der Literatur diskutierten Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Progesteronbindungsstellen, welche in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen werden konnten, mit Gestagenrezeptoren identisch sind, die in bekannten Zielzellen progesteronrezeptorvermittelte Steroidhormonwirkung auslösen.

Was die Anwesentheit von Glucocorticoidrezeptoren in kolorektalen Tumoren anbelangt, stimmen meine Daten mit denen von Lippman (1981) im Grundsatz überein. Jedoch ist der Prozentsatz der rezeptorpositiven Tumorbiopsien in meinen Proben (100%) signifikant größer als der in seinem Untersuchungsmaterial (23%). Die Rezeptornatur des 8S-Binders ist zweifelsfrei nachgewiesen. Die hohen Rezeptorkonzentrationen weisen auf eine bedeutende Rolle des Glucocorticoidrezeptors in der Zellbiologie des Tumors hin. Ob glucocorticoidrezeptorvermittelte Prozesse einen Einfluß auf die Proliferationsaktivität haben, bedarf weiterer Untersuchungen. Neben den bekannten Effekten der Glucocorticoidtherapie bei menschlichen Leukämieformen deuten Berichte aus der Literatur über experimentelle Untersuchungen daraufhin, daß Glucocorticoide die Proliferationsaktivität einiger Tumoren herabsetzt. Bhakoo et al (1981) konnten klar zeigen, daß Glucocorticoide signifikant das Tumorwachstum

hemmten und die mittlere Überlebenszeit von Mäusen mit einem Glucocorticoidrezeptorpositiven malignen Melanom verlängerten. Untersuchungen von Bojar et al (1983) mit verschiedenen Zellinien glucocorticoidrezeptorpositiver Tumoren (menschliches malignes Melanom, verschiedene Zellinen von Bronchialkarzinomen) zeigen, daß im Hamburger-Salmon Assay (1977) Glucocorticoide das Zellwachstum signifikant beeinflussen. Medroxyprogesteronacetat, eine Substanz, die in der Progesterontherapie von hormonabhängigen Tumoren Verwendung findet, zeigte ähnliche Effekte auf das in vitro Tumorwachstum. Trotz der Abwesentheit von Progesteronrezeptoren in diesen Zellinien zeigte sich eine Wirkung, was wahrscheinlich auf die glucocorticoide Nebenwirkung des Medroxyprogesteronacetats zurückzuführen ist.

4.8 Lebertumoren

Wie vor einiger Zeit von Bojar et al (1982) berichtet, enthält normale menschliche Leber spezifische Östrogenbindungskomponenten von niedriger Konzentration (2-15 fmol/mg Zytosolprotein). Die Östrogenbindungskapazität der in dieser Arbeit untersuchten Normalleberbiopsien lagen in derselben Größenordnung. Ähnliche Bindungskapazitäten wurden von Duffy und Duffy (1978) (5-27 fmol/mg Protein), Macdonald et al (1978) (3-13 fmol/mg) und von Friedman et al (1982) gefunden. In meinen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß menschliche FNH ebenfalls spezifische Bindungsaktivitäten enthält. Die Konzentration der Bindungsstellen (3-12 fmol/mg Zytosolprotein) lag in der gleichen Größenordnung wie bei der normalen Leber. Berichte über Steroidrezeptoren in Lebertumoren sind in der Literatur kaum zu finden. In 'case reports' von insgesamt drei Fällen untersuchter Lebertumoren, die die Autoren als 'human nodular hyperplasia', 'human hepatic adenoma' und 'human hepatoma' klassifizierten, wurden Östrogenrezeptorkonzentrationen von 6-66 fmol/mg

Zytosolprotein angegeben. Friedman et al (1982) berichtete von Östrogenrezeptorkonzentrationen im Bereich von 0,9-6,4 fmol/mg Protein. Obwohl in meiner Arbeit die Östrogenbindungskomponenten durch die Affinitätsuntersuchungen, durch die Ligandenspezifität und durch das Sedimentationsverhalten in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation klar als Östrogenrezeptor charakterisiert werden konnten, stellt sich die Frage, ob wegen der geringen Bindungskapazität eine direkte Regulation des Stoffwechsels der Leber und der focal-nodulären Leberhyperplasie durch Östrogene nach den klassischen Rezeptormechanismus möglich ist.
In meinen Untersuchungen konnte ich große Bindungskapazitäten für Org 2058 in Zytosolen aus FNH und normaler Leber nachweisen. Spezifische Progesteronbindung in FNH wurde auch von Macdonald et al (12) nachgewiesen. Obwohl Org 2058 als guter Ligand für die Progesteronrezeptorbestimmung im menschlichen Uterus und nicht-uterus Gewebe (z.B. menschliches Mammakarzinom) beschrieben wurde (Jänne 1976), scheint er bei Bestimmungen in der Leber und der FNH zu falsch-positiven Ergebnissen zu führen. Bei Untersuchungen mit radioaktivem Org 2058 in Kombination mit nichtmarkiertem R5020, findet man nicht den klassischen Gestagenrezeptor. Der bisher noch nicht beschriebene Org 2058-Binder in der Leber unterscheidet sich vom wahren Progesteronrezeptor durch eine erniedrigte Affinität (4-14 x 10 -8 mol/l im Vergleich hierzu 3,7 x 10 -9 mol/l beim Mammakarzinom), durch eine atypische Ligandenspezifität (im Vergleich zum Kalbsuteruszytosol s. Tabelle 13), und das Fehlen des 8S-Binders in der Dichtegradientenzentrifugation bei niedriger Ionenstärke. Die Bedeutung des Org 2058-Binders in der normalen und hyperplatischen menschlichen Leber ist bisher unbekannt. Meine Ergebnisse in Verbindung mit dem von Jänne (1976) und Philibert und Raynand (1974) veröffentlichten Daten deuten weder daraufhin, daß Org 2058 sich an Transcortin

(Korticosteroide bindendes Globulin) bindet, noch daß der Reaktionspartner ein Serumprotein mit niedriger Affinität für Steroide ist. Es ist beschrieben (Jänne 1976), daß die Bindung von R 5020 an weibliche steroidbindende Serumproteine höher ist als die von Org 2058. Im Gegensatz hierzu bevorzugt der Binder im Leberzytosol eindeutig Org 2058.
In menschlichen Hepatomen konnte Friedman et al (1982) keine zytoplasmatischen Progesteronrezeptoren nachweisen.

5. Zusammenfassung

Es wurde ein computergesteuerter Analyse- und Auswerteautomat zur Steroidrezeptoranalytik entwickelt. Als DV-Hardware wurde eine MINC 11 von Digital Equipment ausgewählt. Dieser kontrolliert über digitale Eingabe- und Ausgabe Module, über V-24 Schnittstellen und einem IEEE-Instrumentenbus die gekühlte Pipettiereinheit. Sämtliche Steuer- und Auswertesoftware wurde in der höheren Programmiersprache BASIC erstellt. Die Maschine ist in der Lage, Steroid-Rezeptorbestimmungen in bisher nicht erreichter Qualität und Quantität durchzuführen. 12 Tumorzytosole können in einem Arbeitsgang auf mehrere Steroidrezeptoren untersucht werden. Der Variationskoeffizient liegt sowohl für die Östrogenrezeptorbestimmung als auch Gestagenrezeptorbestimmung unter 10%.
Es konnten Berichte aus der Literatur wiederlegt werden, daß Steroidrezeptoren mit fluoreszenzmarkierten Steroidalbuminderivaten zum Rezeptornachweis geeignet sind. Darüberhinaus konnte kein Rezeptornachweis mit dem Pflanzenöstrogen Coumestrol (Eigenfluoreszenz bei 400 nm) erbracht werden. Fluoreszenztechniken sind für den Rezeptornachweis nicht geeignet.
Durch die Entwicklung thermostabiler Referenzpulver war es erstmals möglich, die Rezeptoranalytik kontrolliert durchzuführen. Die Affinitäten der Rezeptorproteine im

Lyophilisat zeigen keine Unterschiede zu denen im Zytosol. Die Dissoziationskonstanten betrugen beim Östrogenrezeptor 7,1 - 10^{-10} mol/l, beim Androgenrezeptor 2,1 - 0,7 x 10^{-9} mol/l und beim Glucocorticoidrezeptor 1,9 - 0,8 x 10^{-9} mol/l.

Das Sedimentationsverhalten in der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation unterschied sich nicht beim ÖR und GR von dem im frisch gewonnenen Zytosol. Beide Rezeptoren sedimentierten ausschließlich im 8S-Bereich. Der Progesteronrezeptor änderte sein Sedimentationsverhalten nur wenig. Neben dem 8S-Peak zeigte sich beim Kontrollpulver eine breite Schulter bis etwa zum 6S-Bereich. Der Androgenrezeptor hingegen änderte sein Sedimentationsverhalten weitgehend. Die spezifische Bindung war praktisch über den gesamten Gradienten verteilt. Das Maximum lag jedoch auch hier im 8S-Bereich.

Erhitzen auf 60°C für 16 Stunden hatte keinen Einfluß auf die Dissoziationskonstanten, auch zeigte sich keine Änderung im Sedimentationsverhalten. Die Bindungskapazitäten nahmen beim Glucocortcoidrezeptor um etwa 60%, beim Androgenrezeptor um 20% und beim Progesteron- und Östrogenrezeptor um 10% ab. Nach einer Erhitzung auf 80°C war nur noch bei dem Östrogenrezeptor eine deutliche spezifische Bindung zu erkennen. Die Gradientenzentrifugation zeigte eine diffuse Verteilung der Restbindungsaktivität.

In 3480 Biopsien aus Mammakarzinomen wurden Östrogen- und Gestagenrezeptoren bestimmt. Primärtumore und Metastasen zeigten einen unterschiedlichen Rezeptorgehalt. 50% der Primärtumore waren östrogen- und gestagenrezeptorpositiv, bei Metastasen waren es nur 38%. Bei den Östrogenrezeptoren konnte ein signifikanter Anstieg mit dem Alter festgestellt werden. Dies war beim Gestagenrezeptor nicht der Fall.

Beim Östrogenrezeptor ist eine Korrelation zwischen dem prozentualen 8S-Bereich nachgewiesen worden, dieses gilt nicht für den Gestagenrezeptor.

Eine lineare Korrelation zwischen dem Östrogen- und Gestagenrezeptorgehalt konnte nicht gefunden werden. Signifikante saisonale Schwankungen der Rezeptorgehalte konnten ausgeschlossen werden.
Mit einem Wechsel des Rezeptorstatus bei Metastasen ist in ca. 20% zu rechnen, dabei ist mit einem Wechsel von ÖR-/PR- zum ÖR+/PR+ nur im Ausnahmefall zu rechnen.
Der Östrogen- und Gestagenbinder im menschlichen Ovarialkarzinom konnte als Rezeptor im klassischen Sinne charakterisiert werden. Hierfür sprechen die Ergebnisse der Scatchard-Analysen (die Dissoziationskonstanten lagen in der gleichen Größenordnung wie sie in hormonanghängigen menschlichen Mammakarzinomen gefunden wurden), das Sedimentationsverhalten in die Gradientenzentrifugation (8S bzw. 4S und 8S-Bindung) und Spezifitätsuntersuchungen. Rund 46% der Primärtumore sind ÖR+ und PR+. Bei den Metastasen sind dies nur 12%.
Bei den untersuchten Hodentumoren wurden keine signifikanten Mengen an Östrogen-, Gestagen- und Androgenrezeptoren nachgewiesen. Im Gegensatz hierzu enthielten alle untersuchten Tumore bis auf eine Ausnahme Glucocorticoidrezeptoren.
In den Zytosolen aus menschlichen kolorektalen Tumoren wurden nur eine geringe Zahl spezifischer Östrogen- und Gestagenbindungskomponenten (10 fmol/mg Protein) nachgewiesen. Da die wenigen positiven Tumoren praktisch keine 8S-Bindung zeigten, können die Bindungsstellen nicht als Rezeptoren im klassischen Sinne bezeichnet werden. Alle Tumorextrakte zeigten hingegen deutliche Glucocorticoidbindungen, die im Gradienten ausschließlich 8S-Bindung zeigten.
In der FNH wurden Östrogenrezeptoren nachgewiesen. Die Konzentration lag in dem Bereich, wie sie in der normalen Leber zu finden sind (3-12 fmol/mg Protein). Trotz der geringen Konzentration handelt es sich um Rezeptoren im klassischen Sinne (K_D 2 x 10^{-9} mol/l, 4 und

8S-Sedimentationsprofile, regelrechte Spezifität).
Ein bisher nicht beschriebener Binder für (^{3}H) Org 2058 wurde in der Leber und der FNH charakterisiert. Aufgrund der K_D = (9 + 5 x 10^{-8} mol/l) und des Sedimentationsverhaltens (ausschließlich 4S) ist ein Gestagenrezeptor ausgeschlossen. SHGB und Transcortin kommen aufgrund der Bindungsspezifität als Binder nicht in Betracht.

Literatur

Agrez,M.W., Spencer, R.J.: Dis. Colon Rectum 25, 348-359 (1982)

Alford, T.C., Do, H.M., Geelhoed, G.W., Tsangaris, N.T., Lippman, M.E.: Cancer 43: 980-984 (1979)

Allegra, J.C., Lippman, M.E., Thompson, E.B., Simon, R., Barlock, B., Green, L. Huff, S.C.: Cancer Res. 39 (1979) 1447

Allegra, J.C., und Lippman, M.E., In: B. Henningsen, F. Lindner, C. Streichele: Endocrine Treatment of Breast Cancer, Springer, Berlin (1980) 20-25

Bauer, K.H.: Das Krebsproblem, 2. Auflage. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1963.

Beatson, G.T.: Lancet 2 (1896) 104-107

Bergqvist, A., Kullander, S., and Theorell, J.: Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl. 101 (1981) 75-81

Bhakoo, H.S., Paolini, N.S., Milholland, R.S., Lopez, R.E., Rosen, F.: Cancer Res. 41: 1695-1701 (1981)

Bibro, M.C., Schwartz, P.E., Volsi, Li, Eisenfeld, V.A.: Lab. Invest. 40: 241 (1979)

Bloom, H.J.G.: Br.J. Cancer 25: 250-265 (1971).

Bloom, H.J.G.: Renal cancer; in: Stoll, Endocrine Therapy in Malignant Disease, p. 339 (Saunders, London 1972).

Bloom, N.D., Tobin, E.H., Schreibman, B., Degensheim, G.A.: Cancer 45 (1980) 2992

Bohnet, H.G.: Arch. Gynecol. 22: 333-344 (1981)

Bojar, H., Maar, K., Staib, W.: Urol. int. 34: 302-311 (1979)

Bojar, H., Staib, W., Beck, K., Pilaski, J.: Cancer 46: 2770-2774 (1980)

Bojar, H., Stuhldreier, B., Becher, R., Koldovsky, U., Goerz, G., Merk, H., Staib, W.,: Anticancer Research 2: 245-250 (1982a)

Bojar, H., Schütte, J., Staib, W., Broelsch, Ch.: (1982b) Klin. Wochenschau 60: 417-425

Bojar, H.: 2. Wissenschaftliche Tagung der Dt. Gesellschaft für Senologie, Köln (Juni 1982c)

Bojar, H., Petzinna, D.,: Cancer Campaign 7, (1983)

Brunner, K.W., Martz, G.: In: Internistische Krebstherapie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1979) 262

Castaneda, E., Liao, S.: J. Biol. Chem. 250, 883 (1975)

Chamness, G.C., Mercer, W.D., McGuire, W.L.: J. Histochem. Cytochem. 28, 792 (1980)

Concolino, G., Markocchi, A., Di Silverio, F., Conti, C.: J. Steroid Biochem. 7: 923-927 (1975)

Cooper, R.: Proc. Am. Ass. Cancer Res. 10, 15, 1969

Creasman, W.T., Sasso, R.A., Weed, J.C. and McCarty, K.S.: Gynecol. Oncol. 12 (1981) 319-327

Croton, R., Cooke, T., Holt, S., George, W.D., Nicolson, R., Griffiths, K.: (1981) Br. Med. J. 283: 1289-1291

Dandliker, W.B., A.N. Hicks, S.A. Levison, R.J. Brawn, Res.: Commun. Chem. Pharm. 18 (1977) 147

Dandliker, W.B., P.J. Brawn, M.L. Hsu, P.N. Brawn, J. Levin, C.Y. Meyers, V.M. Kolb: Cancer Res. 38 (1978) 4212

Dapunt, O., Daxenbichler, G., and Margretter, R.: Cancer Treat. Rep. 63 (1979) 1186

Darwish, D.H.: Brit. J. Obstet. Gynaecol, 85: 615-623 (1978)

Davy, M., Torjesen, P.A., Aakvaag, A.: Acta Endocrinol. 85: 615-623 (1977)

Daxenbichler, G., Weiß, G., Grill, P., Dapunt, H.J.: Masson Publishing USA, New York (1982a)

Daxenbichler, G., Weiß, G., Ortner, A. und Dapunt, O.: In: Clinical Interest of Steroid Hormone Receptor in Breast Cancer, Recent Results in Cancer Research, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1982b)

Demanes, D.J., Friedman, M.A., McKerrow, J.H., Hoffman, P.G.: Cancer 50 (9) 1828-1832 (1982)

DeSombre, E.R., Carbone, P.P., Jensen, E.V., McGuire, W.L., Wells, S.A., Wittliff, J.L., Lipset, M.B.: (1979), New Engl. J. Med. 301: 1011-1012

Duffy, M.J., Duffy, G.J.: J. Steroid Biochem. 9: 233-235 (1978)

Ehrlich, P.: Lancet, II, 445 (1903)

Fischer, R.I., Neifeld, J.P., Lippman, M.E.: Lancet (1976) 337

Fischer, B., Redmond, C.: New York (1979) 215-226

Fishman, J., Fishman, J.H.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 39, 603 (1974)

Friedman M.A., Demanes D.J., Hoffman P.G.: (1982) Am. J. Med. 73, 362-366

Gaetjens, E., Pertschuk, L.P.: J. Steroid Biochem. 234 (1980) 1090

Galli, M.C., De Giovanni, C., Nicoletti, G., Grillu, S., Nanni, P., Prodi, G., Gola, G., Rochetta, R., and Orlandi, C.: Cancer 47 (1981) 1297-1302

Gapski, R., Whiteley, J.M., Rader, J.L., Cramer, P.L., Henderson, E.B., Neef, V., Huennekens, F.N.: J. Med. Chemistry 18 (1975) 526

Geyer, H.: In: Steroidhormonrezeptoren im Karzinomgewebe 12, Enke Stuttgart, 1982

Ghsoh, L., Ghosh, B.C., Das Gupta, T.K.: J. Surg. Oncol. 19 (1978) 221

Grilli S, De Giovanni C, Galli MC, Gola G, Nanni P, Orlandi C, Prodi G, Rocchetta R: Cancer Treat Rep 63: 1186 (abstract), 1979
Hamburger, A.W., Salmon, S.E.: (1977) Science 197: 461-463

Hayward, J.: Hormones and human breast cancer. Vol.24. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1970

Hähnel, R., Kelsall, R.H., Martin, J.D., Masters, A.M., McCartney, A.J., and Twaddle, E.: Gynecol. Oncol. 13 (1982) 145-151

Henningsen, B.: In: Henningsen, B., Lindner, F., Steichele, C.(Eds.): Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1980) 122-124

Holt JA, Lyttle CR, Lorincz MA, Stern SD, Press MF, Herbst AL: JNCI 67: 307-318, 1981

Horwitz, K.B., W.L. McGuire: Steroids 25 (1975) 497

Horwitz, K.B. and McGuire, W.L.: In: McGuire, W.L., Raynaud, J., P., Baulieu, E.E., (Eds.): Raven Press, New York (1977) 103-124

Horwitz, K.G., McGuire, W.L.: J. Biol. Chem. 253 (1978) 2223

Huggins, Ch. and Ling, Y.: Ann. Surg. 136 (1952) 595-603

Hughes, A., Jacobson,H.I., Wagner, R.K., Jungblut, P.W.: Molecular and Cellular Endocrinology 5 (1976) 397

Jänne, O., Kontula, K., Vihko, R.: J. Steroid Biochem. 7, 1066-1068 (1976)

Jänne, O., Kauppila, A., Syrjälä, P., and Vihko, R.: Int. J. Cancer 25 (1980) 175-179

Jensen, E.V. and Jacobson, H.I.: In: Biological (G. Pincus and E. Vollmer, eds.), Academic Press, New York, 161-178 (1960)

Jensen, E.V. and Jacobson, H.L.: Recent Progr. Hormone Res., 18, 387 (1962)

Jensen, E.V., DeSombre, P.W., Jungblut, P.W.: Univ. Chicago Press, Jr. Chicago (1967) S. 15

Jensen, E.V., DeSombre, E.R.: In: Modern Pharmacology-Toxicology Volume 81, 240 (Pasqualini, J.R. Hrsg) Marcel Dekker Inc., New York und Basel (1977)

Jensen, E.V., Greene, G.L., Closs, L.E., DeSombre, E.R., Nadji,M.: Rec. Prog. in Horm. Research, Vol. 38 (1982)

Jonat, W., H. Maas: Cancer Res. 38 (1978) 4305

Jonat, W.: In: Steroidhormonrezeptoren im Karzinomgewebe, Enke Stuttgart, 1982

Kennedy, B.J.: Surg. Gynec. Obstet. 120 (1965) 1246-1250

Keshgegian, A.A., Wheeler, J.E.: Cancer 45 (2) 293-296 (1980)

Kiang, D.T., Kennedy, B.J.: J. Amer. Med. Assoc. 238: 32-34 (1977)

Knight, A.W., Livingston, R.B., Gregory, E.J., McGuire, W.L.: Cancer Res. 37 (1977) 4669

Koenders, A.J.M., Beex, L.V.M., Benraad, Th. J.: Raven Press, New York 1980, 247

Langley, J.N.: J. Physiol. 33, 374 (1905)

Lee, S.H.: Am. J. Clin. Pathol. 70, 197-203 (1978)

Lee, S.H.: persönliche Mitteilung in Bethasta 1979

Lee, S.H.: Am. J. Clin. Path. 73, 323-329 (1980)

Lippman, M.E., Allegra, J.C., Thompson, E.B., Simon, R., Barlock, A., Green, L., Huff, K.K., Do, H.M.T., Aitken, S.C., Warren,R.: N.Engl. J. Med. 298 (1978) 1223-1228

Longcope, C: J. Am. Geriatr. Soc. 26 (4) 145-148 (1978)

Lowry, O.H., Rosebrought, A.L., Farr, A.L., Randall, R.J.: (1951) J. Biol. Chem. 193: 265-275

Maass, H.Jonat, W.: Onkologie 3, 140 (1980)

Macdonald, J.S., Lippman, M.E., Woolley, P.V., Petrucci, P.P., Schein, P.S.: Cancer Chemother. Pharmacol. 1, 135-138 (1978)

Maillot, K.v., Hermanek, P., Gentsch, H.: J. Cancer Res. Clin. Oncol. 93 (1979) 77-84

Maillot, K.v.: In: Steroidhormonrezeptoren im Karzinomgewebe, Enke Stuttgart 1982

Malan, I.B., Janss, D.H.: In Vitro 14 (1978) 339

McGuire, W.L., Carbone, P.P., Sears, M.E. and Escher, G.C.: An overview. In: Carbone, P.P., Vollmer, W.C., and McGuire, W.L. (Eds.): Raven Press, New York (1975a) 1-30

McGuire, W.L.: In: Methods in Enzymology 36, Academic Press, New York, 248 (1975b)

McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Pearson, O.H., Segaloff, A.: (1977) Cancer 39, 2934

McGuire, W.L., Horwitz, K.B., Zara, D.T., Garola, R.E., Chamness, G.C.: Metabolism, 27 (1978) 487

McGuire, W.L.: Raven Press, New York (1980), 239

Meldrum, D.R., Davidson, B.J., Tataryn, I.V., Judd, H.L.: Obstet Gynecol, 57 (5) 624-8 (1981)

Mercer, W.D., C.A. Carlson, T.M. Wahl: Fed. Proc. 37 (1978) 1312

Mouridsen, H.T., Palshof, T., Patterson, J. and Battersby, L.: Cancer Treat. Rep. 5 (1978) 131-141

NAGAI, R., KATAOKA, M., KOBAYASKI, S., ISHIHARA, K., TOBIOKA, N., NAKASHINA, K., MARUSE, M., SAITO, K., SAHUMA, S.: Canser Res 39 (5): 1834-1840, 1979

Nenci, I., Beccati, M.D., Piffanetti, A., Lanza, G.: J. Steroid Biochem. 7 (1976) 505

Noltenius, H., Bethge, R.: Wehrmed. Mschr. Heft 9/1980

O'Malley, B.W., McGuire, W.L., Kohler, P.O., Korenman, S.G.: Recent Prog. Horm. Res. 25, 105 (1969)

Pannuti, F.: Onkologie 2 (1979) 54-60

Pertschuk, L.P., Tobin, E.H., Brigati, D.J., Kim, D.S., Bloom, N.D., Gaetjens, E., Berman, P.J., Carter, A.C., Degenshein, G.A.: Cancer 41 (1978) 907

Pertschuk, L.P., Gaetjens, E., Carter, A.C., Brigatic, A.J., Kim, D.S., Fealey, T.E.: Am. J. Clin. Pathol. 71, 504-508 (1979)

Philibert, D., Raynaud, J.P.: Contraception 10: 457-466 (1974)

Pollow, K.H., Lübbert, H., Boquoi, E., Kreutzer, G., Pollow, B.: Endocrin. 96 (1975) 319

Pollow, K., Boquoi E., Baumann, J., et al: Mol Cell. Endocrinol 6 (4-5): 333-348

Rajaniemi, H., Kauppila, A., Rönnberg, L., Selander, K., Pystynen, P.: Acta Obstet. Gynecol, Scand. Suppl. 101: 83-86 (1981)

Rao, B.R., Fry, C.G., Hunt, S., Kuhnel, R., Dandliker, W.B.: Cancer 46, 2902-2906 (1980)

Raynaud, J.P., Ojasoo, T., Dalarue, J.C., Magdelenat, H., Martin, P., Philibert, D.,: In: Progesterone receptors in normal and neoplastic Tissues. Raven Press, New York 1977

Reiner, G., Bieglmayer, C., Jakesz, R., Kees, A., Kolb, R., Spona, J.: Wiener klin. Wochenschr., 93 (11), 339-342 (1981)

Remmele, W., Heicke, B., Heine, M., Frank, K., Keogh, H.J., Schmitt, H.: Deutsches Ärzteblatt, 4, 25-30 (1982)

Rich, M.A., Furmanski, P., Brookes, S.C.: Cancer Res. 38 (1978) 4296

Rosen, P.P., Medendez-Botet, C.J., Urban, J.A., Fracchia, A., Schwartz, M.K.: Cancer 39, (1977), 2194

Salmon, S.E. (Ed.): Progr. Clin. Biol. Res. Vol. 48. alan R. Liss Inc., New York (1980)

Samuels, M.L., Sullivan, P. and Howe, C.D.: Cancer 22, 525 (1968)

Scatchard, G.: Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1949) 660-672

Sica, V., Contieri, E., Nola, E., Bova, R., Papaleo, G., Puca, G.A.: Tumori, 67 (4) 307-14 (1981)

Stedman, K.E., Moore, G.E., Morgan, R.T.: Arch. Surg. 115: 224-253 (1980)

Tagnon, H.J.: Cancer 39 (1977) 2959-2964

Testart, J., Frydman, R., Roger, M. J.: Clin. Endocriol. Metab. 55 (2) 374-7 (1982)

Wagner, R.K.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 353 (1972) 1235-1245

Walker, R.A., Cove, D.H., Howell, A.: Lancet 1, 109-118 (1980)

Webster, D.J.T., Bronn, D.G., Minton, J.P.: Am. J. Surg. 136 (1978) 337

Wittliff, J.L., Hilf, R., Brooks, W.F.Jr.: Cancer Res. 32, 1983 (1972)

Wittliff, J.L.: Seminars in Oncology 1 (1974) 109-118

Wittliff, J.L., Beatty, B.W., Savlov, E.D., Cooper, R.A.: In: Estrogen Receptors in Breast Cancer 1, 393, Elsevier/North-Holland Press (1977)

Wittliff, J.L.: Steroid Receptors in Breast Cancer, 27.-29. Juni 1979, National Institute of Health, Bethseda, Maryland

Würz, H.: Tumor Diagnostik & Therapie 4, 15-20 (1983)

L e b e n s l a u f

Personalien

Name	Dieter Petzinna
Geburtsdatum	09.07.1949
Geburtsort	Düsseldorf
Wohnort	Kölner Landstr. 80 4000 Düsseldorf 13
Eltern	Erwin Petzinna und Ehefrau Herta, geb. Döhrn

Ausbildung

April 1956	Einschulung Volksschule, Düsseldorf
April 1960	Realschule, Wesel Abschluß: Mittlere Reife
April 1966	Gymnasium
März 1970	Abiturprüfung beim Schulkollegium in Düsseldorf
WS 1970	Chemiestudium Universität Münster
April 1976	Diplomprüfung
WS 1976	Medizinstudium
SS 1977	Wechsel zur Universität Düsseldorf
Juni 1982	Approbation Promotion, Orthopädische Klinik Universität Düsseldorf Thema: Das Zervikalsyndrom
seit 1980	wissenschaftlicher Angestellter im Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf

Die vorliegende Dissertationsschrift ist das Ergebnis von Arbeiten, die in der Zeit von Oktober 1977 bis Mai 1983 im Institut für Physiologische Chemie II der Universität Düsseldorf durchgeführt wurden.
Herrn Prof. Dr. W. Staib danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen, und für die in dieser Zeit erfahrene Förderung.
Herrn Prof. Dr. H. Bojar danke ich herzlich für die stets anregenden Diskussionen und seinen freundschaftlichen Rat.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353